

Eisentransport in Chloroplasten - der PIC1-NiCo-YGGT Proteinkomplex

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Peter Anton Hagl

München
07.09.2017

Dissertation eingereicht am: 07.09.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Katrin Philippar

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Nickelsen

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 12.12.2017

Peter Hagl

Erklärung

Ich habe zuvor nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Die Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt.

München, den 12.12.2017

Peter Hagl

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Einheiten	VIII
I. Zusammenfassung	1
II Einleitung.....	3
II.1 Übergangsmetalle in Pflanzen	3
II.2 Eisenaufnahme über die Wurzel	4
II.3 Eisentransport innerhalb der Pflanze	8
II.4 Eisentransport in Chloroplasten	11
II.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
III Material.....	19
III.1 Chemikalien	19
III.2 Enzyme.....	19
III.3 Vektoren und Konstrukte.....	19
III.4 Oligonukleotide	20
III.5 Molekulargewichts- und Größenstandards	22
III.6 Antikörper	22
III.7 Bakterien- und Hefestämme	23
III.8 Pflanzenmaterial.....	23
IV Methoden.....	24
IV.1 Pflanzenphysiologische Methoden.....	24
IV.1.1 Anzuchtbedingungen.....	24
IV.1.2 Anzucht der RNAi-Linien in Hydrokultur.....	25
IV.1.3 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
IV.1.4 Induzierbarer RNAi.....	27
IV.1.5 Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
IV.1.6 Isolation von Mesophyllprotoplasten aus <i>Nicotiana benthamiana</i>	28
IV.1.7 GUS-Färbung.....	29
IV.2 Mikrobiologische Methoden.....	30
IV.2.1 Medien und Kultur.....	30
IV.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
IV.2.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
IV.2.2 Herstellung und Transformation transformationskompetenter Zellen.....	31
IV.2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	31

IV.2.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
IV.2.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
IV.2.3 Split-Ubiquitin-System.....	32
IV.2.3.1 Split-Ubiquitin-System auf Interaktions-Kontrollmedium.....	32
IV.2.3.2 Erstellung von PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Vektor	33
IV.2.3.3 Umklonierung der PIC1 TonB-Box-Mutanten vom Prey- in den Bait-Vektor	33
IV.3 Molekularbiologische Methoden	38
IV.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
IV.3.2 Klonierungsstrategien.....	39
IV.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA	39
IV.3.4 Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
IV.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	40
IV.3.6 Sequenzierung von DNA	40
IV.3.7 RNA-Isolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
IV.3.8 Reverse Transkription	41
IV.3.9 Quantitative Echtzeit-RT-PCR	41
IV.4 Biochemische Methoden.....	42
IV.4.1 Isolierung von Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten	42
IV.4.2 Nachreinigung innerer Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten	42
IV.4.3 Native Fraktionierung von inneren Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten.....	42
IV.4.3.1 Dichtegradientenzentrifugation	42
IV.4.3.2 "Blue-Native" Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	43
IV.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
IV.4.5 Immunodetektion von Proteinen.....	44
IV.4.5.1 Elektrottransfer von Proteinen	44
IV.4.5.2 Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper.....	45
IV.5 Lichtmikroskopie und Transmissions-Elektronenmikroskopie	46
V Ergebnisse	47
V.1 HI1, ein potentieller Regulator der Eisenhomöostase in Pflanzen	47
V.1.1 Subzelluläre Lokalisation von HI1	48
V.1.2 Charakterisierung von <i>HI1</i> -Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
V.1.2.1 Charakterisierung der <i>HII</i> -T-DNA-Insertionslinien.....	50
V.1.2.2 Erzeugung von <i>HII</i> -Antisense- und <i>HII</i> -RNAi-Linien	52
V.2 Die Eisenpermease PIC1 und deren potentielle Interaktionspartner	52
V.2.1 Subzelluläre Lokalisation der NiCo-Proteine mit Hilfe des p19-Helferplasmids.....	54
V.2.2 YGGT als potentieller dritter Interaktionspartner im PIC1-NiCo-YGGT-Komplex.....	56

V.3 Das PIC1-NiCo-YGGT-Metalltranslocon in Chloroplasten	56
V.3.1 Überprüfung eines PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes über native Fraktionierung.....	57
V.3.1.1 Fraktionierung der IE von Chloroplasten über Dichtegradientenzentrifugation	58
V.3.1.2 Fraktionierung der IE von Chloroplasten über eine "Blue-Native"-PAGE	60
V.3.2 Die TonB-Box-Domäne in PIC1 als möglicher Interaktionsvermittler.....	61
V.3.2.1 Hefe-Split-Ubiquitin-Tests zum Nachweis einer PIC1-NiCo-YGGT-Interaktion	62
V.4 Charakterisierung der <i>PIC1</i>, <i>NiCo1/2</i> und <i>YGGT-B/C</i> "knock down"-Mutanten	70
V.4.1 Charakterisierung der <i>YGGT-C</i> "knock down"-Mutante.....	70
V.4.2 Charakterisierung der <i>PIC1</i> - , <i>NiCo1/2</i> - und <i>YGGT-C</i> -RNAi-Linien.....	72
V.4.3 Phänotypische Charakterisierung der RNAi-Linien im Sämlingsstadium.....	79
V.4.4 Hydrokulturansatz zur Anzucht von <i>Arabidopsis</i>	86
V.4.5 Phänotypische Untersuchung der RNAi-Linien im Rosettenblatt-Stadium	89
VI Diskussion.....	97
VI.1 HI1, ein potentieller Regulator der Eisenhomöostase in Pflanzen	97
VI.2 Die Proteine PIC1, NiCo und YGGT bilden einen Komplex	98
VI.3 Die PIC1 TonB-Box ist essentiell für die PIC1-PIC1- und PIC1-NiCo-Interaktion ..	100
VI.4 PIC1, NiCo1/2 und YGGT-C sind essentiell für die pflanzliche Eisenhomöostase .	103
VI.5 PIC1 und TIC20 interagieren nicht miteinander und bilden keinen Komplex.....	106
VI.6 Das PIC1-NiCo-YGGT-Metalltranslocon.....	107
VI.7 Ausblick	110
VII Literatur.....	113

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kassette (ATP binding cassette)
AP	Apoplast
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATPase	Adenosintriphosphatasen
BASTA	Herbizid (Glufosinat-Ammonium)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (bimolecular fluorescence complementation)
BN	"Blue-Native"
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CCT	Codon (Cytosin, Cytosin, Thymin)
cDNA	complementäre (copy-) DNA
Col-0	Columbia-0 Ökotyp
cTP	chloroplastidäres Transitpeptid
Dex	Dexamethason
DIG	Digoxigenin
DMS	Deoxy-Mugineinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)

GGA	Codon (Guanin, Guanin, Adenin)
GS-S-SG	Glutathion-Polysulfid
GSSG	Glutathion-Disulfid
GUS	β -Glucuronidase
HA-Tag	Protein-Tag (human influenza hemagglutinin)
he	heterozygot
His	Histidin
HMW	Protein-Größenstandard (high molecular weight)
ho	homozygot
HX ₅ DH	Histidin-Motiv
IE	Innere Chloroplastenhüllmembran (inner envelope)
IgG	Immunoglobulin G
IMR	Intermembranraum
LB	Medium (lysogeny broth)
Leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
<i>luc</i>	RNAi-Linie mit Luciferase-RNAi-Konstrukt
Me-bind	Metallbindend
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mOD	Milli-OD
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Murashige-Skoog Salz
N-Terminus	Amino-Terminus
NA	Nicotianamin
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
NubG	N-terminale Hälfte von Ubiquitin mit einer Isoleucin zu Glycin Mutation
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 Nanometer
OE	äußere Chloroplastenhüllmembran (outer envelope)
OEP	Protein der äußeren Chloroplastenhüllmembran (outer envelope protein)
OM	äußere Membran (outer membrane)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
Ps	<i>Pisum sativum</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative PCR auf revers transkribierter RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR auf revers transkribierter RNA
SA	Standardabweichung
SD	Medium (synthetic defined)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecal sulfate)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance)
T-DNA	Transfer-DNA
T0 (1, 2, 3, 4)	Transformanten(generation) 0 (1, 2, 3, 4)
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temed	Tetramethylethyldiamin
TGC	Codon (Thymin, Guanin, Cytosin)
THY	Thylakoide
Ti	Tumor induzierend
TIC	Translocon der inneren Chloroplastenhüllmembran
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
TTBS	Puffer (Tris-buffered saline with Tween 20)
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UTR	Untranslatierter Bereich (untranslated region)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
W5	Waschpuffer

xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure
YPD	Medium (yeast extract, peptone, dextrose)

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
M	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mOsm	Milliosmol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
sec	Sekunde
V	Volt
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

I. Zusammenfassung

Eisen ist aufgrund seines Redoxpotentials integraler Bestandteil physiologisch relevanter Prozesse in Chloroplasten. So spielt es als Komponente der Elektronentransportkette eine zentrale Rolle in der Photosynthese und ist auch an der Synthese von Eisen-Schwefel- und Häm-Proteinen beteiligt. Um den hohen Bedarf an Eisen zu decken, sind effiziente Transportsysteme nötig, die Eisen über die Chloroplastenhülle hinweg importieren. Jedoch besitzt Eisen auch großes Gefahrenpotential, da es über die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies toxisch wirken kann. Ein Netzwerk aus strikter Kontrolle von Import, Nutzung, Speicherung und Export des Eisens ist für Pflanzen daher unerlässlich. Das Protein HI1 ist eine potentielle Komponente dieser Eisenhomöostase, konnte über GFP-Targeting bisher allerdings nicht genau subzellulär lokalisiert werden. Ebenfalls zeigten die untersuchten Mutanten mit einer T-DNA-Insertion im Genabschnitt vor dem Transkriptionsstart unter Standardbedingungen keinen auffälligen Phänotyp. Jedoch wurden mehrere unabhängige *HI1*-RNAi-Linien erzeugt, die nun in der T2-Generation für eine umfassendere Phänotypisierung zur Verfügung stehen, um die Funktion von HI1 zu untersuchen. Die Beteiligung der Permease PIC1 an der Eisenhomöostase hingegen gilt bereits als gesichert, wobei nun nachgewiesen werden konnte, dass PIC1 mit den beiden Proteinen NiCo und YGGT einen Komplex bildet. In Hefe-Split-Ubiquitin-Tests mit den Proteinen aus *Arabidopsis*, kam es sowohl zwischen PIC1 und PIC1 als auch zwischen PIC1 und den beiden Proteinen NiCo1 und NiCo2 zu einer Interaktion. Dabei hat in der Vermittlung dieser Interaktion die PIC1 TonB-Box-Domäne eine essentielle Funktion. Während es bei einer Deletion oder massiven Strukturänderung der TonB-Box zu einem vollständigen Verlust der Interaktion kommt, konnte nun gezeigt werden, dass insbesondere das Valin an der Position 55 des PIC1 Proteins als Bestandteil des stark konservierten TonB-Box-Cores, eine entscheidende Rolle spielt. So hatte die Mutation dieser Aminosäure einen stark negativen Effekt auf die Interaktion. In weiteren Tests interagierten die Proteine YGGT-B und YGGT-C zwar nicht mit PIC1 jedoch mit NiCo1 und NiCo2. Über eine native Fraktionierung der Proteinkomplexe innerer Hüllmembranen aus Chloroplasten von Erbse, wurde zudem die Co-Akkumulation der Proteine PIC1, NiCo und YGGT in den Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten gezeigt. Dieses Ergebnis konnte durch den Nachweis der Co-Migration von PIC1, NiCo und YGGT in der zweiten Dimension einer "Blue-Native"-PAGE bestätigt werden. Zum ersten Mal konnte daher zusätzlich zum Interaktionsnachweis im heterologen System Hefe, die Bildung eines

PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes durch eine biochemische, native Aufreinigung von inneren Hüllmembranen aus Chloroplasten bestätigt werden. RNAi-Linien der Proteine PIC1, NiCo1/2 und YGGT-C in *Arabidopsis* wiesen zudem einen vergleichbaren Eisenmangel-Phänotyp wie Chlorosen, gestörte Mesophyll-Organisation und geschädigte Chloroplasten auf. Ein speziell für die Phänotypisierung von RNAi-Linien entwickeltes Hydrokultursystem ermöglichte dabei die RNAi-Induktion und somit die Phänotypisierung bei Pflanzen im Rosettenblatt-Stadium. Die Proteine PIC1, NiCo und YGGT bilden somit nicht nur einen Komplex, sondern spielen jeweils auch eine entscheidende Rolle in der Eisenhomöostase von Pflanzen, in der sie wahrscheinlich zusammen innerhalb des Komplexes als Metalltranslocon fungieren. Unterstützung erhält ein solches PIC1-NiCo-YGGT-Translocon durch Parallelen zu den bakteriellen ABC-Transportern CbiMNQO/NikMNQO, die Cobalt bzw. Nickel transportieren. Zukünftige funktionelle Analysen werden dabei weitere Erkenntnisse über die genaue Funktion des Komplexes und seiner Untereinheiten liefern.

II Einleitung

II.1 Übergangsmetalle in Pflanzen

Übergangsmetalle wie Eisen, Kupfer und Mangan sind imstande mehrere Oxidationsstufen einzunehmen und somit Elektronen reversibel abzugeben und auch wieder aufzunehmen. Aufgrund dieser Eigenschaften nehmen sie in Pflanzen eine essentielle Rolle in einigen physiologisch wichtigen Redoxreaktionen ein. Im katalytischen Zentrum des Wasserspaltungskomplexes des Photosystems II befinden sich vier Mangan-Atome. Diese sind an der Spaltung von Wasser beteiligt, wodurch Protonen zum Aufbau eines Protonengradienten und Elektronen für die Elektronentransportkette der Photosynthese zur Verfügung gestellt werden. Auch Kupfer und vor allem Eisen übernehmen relevante Aufgaben in der Elektronentransportkette der Photosynthese (Raven et al., 1999). So ist Kupfer als Co-Faktor integraler Bestandteil des Plastocyanins, welches die Übertragung von Elektronen vom Cytochrom- b_6f -Komplex zum Photosystem I bewerkstelligt und dabei zwischen den Oxidationsstufen Cu^{II} und Cu^{I} wechselt. Wohingegen Eisen in der Elektronentransportkette der Photosynthese als Bestandteil von Eisen-Schwefel- und Häm-Komplexen eine große Rolle spielt und dabei als am häufigsten auftretendes Übergangsmetall an mehreren Übergaben von Elektronen beteiligt ist. Aber auch in der Atmungskette ist Eisen am Elektronentransport beteiligt. Kupfer wiederum reduziert als Co-Faktor der Cytochrom-c-Oxidase, Sauerstoff zu Wasser (Tsukihara et al., 1995). Eisen, Kupfer und Mangan sind zudem Co-Faktoren von Superoxid-Dismutasen, Enzymen die potentiell schädliche, reaktive Sauerstoffradikale zu H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) umwandeln, das wiederum durch Katalasen zu H_2O (Wasser) umgesetzt wird (Scandalios et al., 1997; Alscher et al., 2002). So wichtig Übergangsmetalle, allen voran Eisen, aber auch für Pflanzen sind, birgt doch ein Überschuss in den Zellen gewisse Gefahren. Über die Fenton-Reaktion katalysieren freie Eisen-Ionen (Fe^{2+} und Fe^{3+}) die Bildung von reaktiven Hydroxyl-Radikalen aus H_2O_2 und sind damit für den Hauptanteil der reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen verantwortlich (Sharma et al., 2012). Da Eisen aber aktiv von Pflanzen aufgenommen wird, wird es bei einem Überschuss nicht etwa wieder ausgeschieden, sondern gespeichert, was aufgrund seiner Reaktivität in gesicherter Form als Fe(III)-Phosphat im Protein Ferritin geschieht (Merchant, 2006; Briat et al., 2009). Da Eisen essentielle Funktionen in Pflanzenzellen übernimmt, bei einer zu hohen Konzentration jedoch toxisch wirkt, unterliegen

dessen Aufnahme und Verteilung innerhalb der Pflanze, die Nutzung, sowie die Speicherung einem strikten Regulationsnetzwerk.

II.2 Eisenaufnahme über die Wurzel

Eisen ist eines der am häufigsten vorkommenden Metalle in der Erdkruste und dennoch ist dessen Verfügbarkeit für Pflanzen oft limitiert. Bei Anwesenheit von Sauerstoff und neutralen bis alkalischen pH-Werten, was auf ca. 30 % der bestellbaren Flächen zutrifft, liegt Eisen generell in Form unlöslicher Fe(III)-Oxide vor, die von Pflanzen nicht aufgenommen werden können (Marschner, 1995; Morrissey und Guerinot, 2009). So beträgt die Konzentration von löslichem Fe(III) bei einem pH-Wert von 7,0 ca. 10^{-18} M und weicht damit weit von der Konzentration von ca. 10^{-7} M ab, die für optimales Pflanzenwachstum nötig wäre (Lindsay und Schwab, 1982). Um dennoch das im Boden vorliegende Eisen nutzen zu können, entwickelten Pflanzen zwei voneinander verschiedene Strategien zur Eisenaufnahme (Abb. 1). Während Landpflanzen mit Ausnahme der Gräser auf die reduktionsbasierte Strategie I zurückgreifen und reduziertes Eisen aus dem Boden aufnehmen, nehmen Gräser an zuvor in die Rhizosphäre exkretierte Chelatoren gebundenes Fe(III) über die Wurzel auf (Strategie II); (Römheld und Marschner, 1986; Kobayashi und Nishizawa, 2012). Bei Eisenmangel entlassen Strategie-I-Pflanzen, vermittelt durch P-Typ H^+ -ATPasen, Protonen über die Plasmamembran der Wurzel in den Boden, was zu einer Ansäuerung der Rhizosphäre führt und somit die Löslichkeit des Fe(III) erhöht. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* erfolgt die Abgabe von Protonen in die Rhizosphäre dabei hauptsächlich über die H^+ -ATPase *AHA2* (*Arabidopsis* plasma membrane H^+ -ATPase 2; Santi und Schmidt, [2009]). Zusätzlich exkretieren diese Pflanzen phenolische Verbindungen in die Rhizosphäre, welche die Löslichkeit des Eisens weiter unterstützen. So wurde der ABCG37-Transporter in *Arabidopsis*-Wurzeln charakterisiert, der bei Eisenmangel die Ausscheidung phenolischer Verbindungen in die Rhizosphäre vermittelt (Fourcroy et al., 2014). Diese phenolischen Verbindungen chelatisieren Fe(III), woraufhin es an der Plasmamembran der Wurzelepidermiszellen zu einer Reduktion des Fe(III) zum löslicheren Fe^{2+} durch eine Fe(III)-Chelat-Reduktase kommt. *AtFRO2* (*Arabidopsis thaliana* ferric-chelate reductase/oxidase 2) ist die Haupt-Fe(III)-Chelat-Reduktase des Eisenmetabolismus in *Arabidopsis* und *AtFRO2* hauptsächlich in den Wurzeln exprimiert, wobei die Expression bei Eisenmangel stark erhöht ist. Zudem kann *AtFRO2* die Fe(III)-Reduktase-Aktivität der *Arabidopsis frd1-1* Mutante (ferric-chelate reductase defective 1) wiederherstellen (Robinson et al., 1999; Wu et al., 2005). Durch den hochaffinen Fe^{2+} -Transporter IRT1 (iron regulated transporter 1) wird Fe^{2+} anschließend über die

Plasmamembran in die Zellen der Wurzelepidermis transportiert. Über Hefe-Komplementationsstudien konnte durch Messung der Aufnahmeraten von ^{55}Fe gezeigt werden, dass IRT1 aus *Arabidopsis* die Eisenaufnahme in Hefe-Doppelmutanten des niedrigaffinen und hochaffinen Fe(II)-Transportes (*fet3fet4*) unter Eisenmangelbedingungen wiederherstellt (Eide et al., 1996). Bei Eisenmangel wird *IRT1* ebenfalls in der Wurzel exprimiert und *irt1* Mutanten in *Arabidopsis* weisen einen chlorotischen, im Wachstum stark eingeschränkten Phänotyp auf, welcher durch Eisengaben aufgehoben werden kann (Vert et al., 2002). Die Expression von *ABCG37*, sowie der Gene *AHA2*, *FRO2* und *IRT1* wird durch das Protein FIT (FER-like iron-deficiency induced transcription factor), einem bHLH-Typ Transkriptionsfaktor bei Eisenmangel reguliert (Rodríguez-Celma und Schmidt, 2013; Brumbarova et al., 2015).

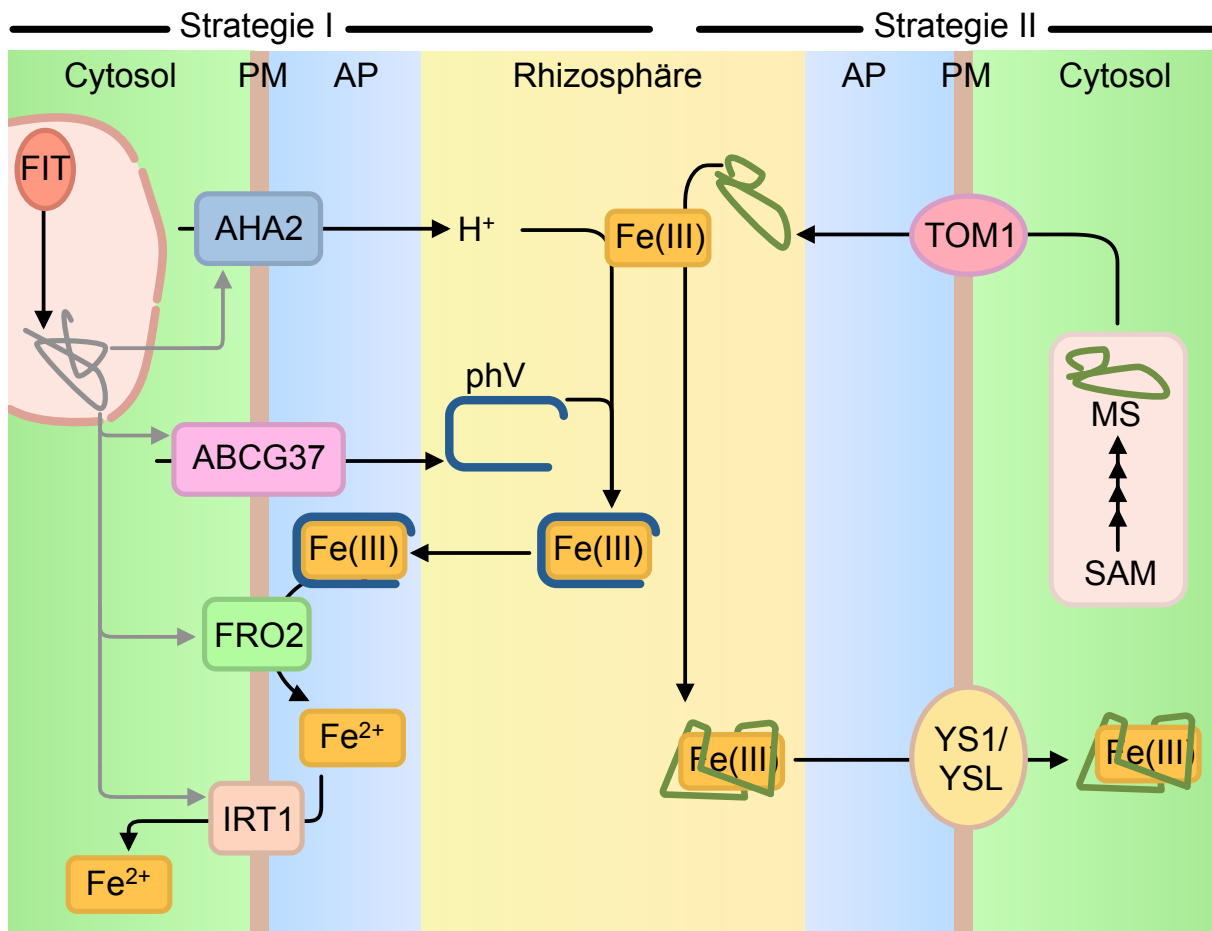


Abbildung 1: Strategien zur Eisenaufnahme aus dem Boden.

Strategie I: In *Arabidopsis* werden Protonen (H⁺) durch die H⁺-ATPase AHA2 aus der Wurzel ausgeschleust, um die Rhizosphäre anzusäuern und dadurch die Löslichkeit des Fe(III) zu erhöhen. Durch den ABC-Transporter ABCG37 werden zudem phenolische Verbindungen (phV) exportiert, die das Fe(III) chelatisieren, welches im Apoplasten (AP) an der Plasmamembran (PM) der Wurzelepidermiszellen von FRO2 zu Fe²⁺ reduziert wird. Von IRT1 wird Fe²⁺ im Anschluss in die Zellen importiert. Bei Eisenmangel erfolgt die Regulation der Genexpression von AHA2, ABCG37, FRO2 und IRT1 durch den Transkriptionsfaktor FIT. Strategie II: In Strategie II-Pflanzen erfolgt aus S-Adenosyl-L-Methionin über vier Schritte die Synthese von Mugeinsäuren (MS), Phytosiderophoren welche von TOM1 über die Plasmamembran in die Rhizosphäre transportiert werden. Dort bilden die Phytosiderophore zusammen mit Fe(III) lösliche Chelate, die im Anschluss über YS1/YSL-Transporter in die Wurzel importiert werden. Schematische Darstellung nach Kobayashi und Nishizawa (2012) und Brumbarova et al. (2015).

Anders als bei Strategie I-Pflanzen, wird Fe(III) bei Strategie II-Pflanzen nicht reduziert, sondern chelatisiert und als Chelat von der Wurzel aufgenommen. Hierfür exkretiert die Pflanze zuerst Phytosiderophore welche zur Familie der Mugeinsäuren gehören, in die Rhizosphäre, wobei bisher neun Typen von Mugeinsäuren identifiziert wurden (Kobayashi und Nishizawa, 2012). Diese Phytosiderophore werden in einem konservierten, vierstufigen Syntheseweg gebildet, wobei die Expression der Gene der beteiligten Enzyme bei Eisenmangel stark induziert wird (Kobayashi und Nishizawa, 2012; Nozoye et al., 2015). Über TOM1 (transporter of mugeinic acid family phytosiderophores 1), einem

Efflux-Transporter aus Reis, werden die Mugineinsäuren über die Plasmamembran der Wurzelepidermiszellen in die Rhizosphäre transportiert. Bei Eisenmangel ist die Expression von *TOM1* stark induziert und darüber hinaus weisen *TOM1*-überexpmierende Reispflanzen verstärkte Toleranz gegenüber Eisenmangel auf (Nozoye et al., 2011; Nozoye et al., 2013). Die ausgeschiedenen Mugineinsäuren haben sechs Koordinationsstellen an die Eisen bindet, wobei angenommen wird, dass Mugineinsäuren mit Eisen oktaedrische, lösliche Chelate bilden (Nozoye et al., 2015). Die Fe(III)-Mugineinsäurechelate werden anschließend über die YS1- (yellow stripe 1) und YSL-Transporter (yellow stripe 1-like) in die Wurzeln transportiert, wobei gezeigt wurde, dass die Maismutante *ys1* nicht mehr imstande war Fe(III)-Phytosiderophor-Komplexe aufzunehmen (Curie et al., 2001; Inoue et al., 2009). Außerdem stellt YS1 die Eisenaufnahme von Eisenaufnahme-Mutanten in Hefe (*fet3fet4*) auf Fe(III)-Phytosiderophor-Medium wieder her und die Expression von *YS1* ist außerdem bei Eisenmangel in Wurzeln induziert (Curie et al., 2001). In Wurzelepidermiszellen von Reis ist die Expression von *OsYSL15* bei Eisenmangel induziert und *OsYSL15* wurde in der Plasmamembran von Zwiebelepidermiszellen lokalisiert. Des Weiteren konnte *OsYSL15* das Wachstum der Hefe-Mutante *fet3fet4* unter Zugabe von Fe(III)-Deoxy-Mugineinsäure wiederherstellen. Zusätzlich wurde der Transport von Fe(III)-Deoxy-Mugineinsäure durch *OsYSL15* in Eizellen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) nachgewiesen (Inoue et al., 2009). Zunehmend zeichnet sich jedoch ab, dass die Grenzen der Eisenaufnahmemechanismen nicht strikt zwischen Strategie I- und Strategie II-Pflanzen zu ziehen sind, da auch Strategie II-Pflanzen wie Reis und Mais auf Komponenten der Strategie I zurückgreifen. So wurden in Reis sowohl der Efflux-Transporter PEZ2 (phenolics efflux zero-like 2), der ähnlich zu Strategie I phenolische Verbindungen transportiert, als auch die Fe^{2+} -Transporter OsIRT1, OsIRT2 und OsNRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) beschrieben (Ishimaru et al., 2006; Bashir et al., 2011; Ishimaru et al., 2011; Takahashi et al., 2011; Kobayashi et al., 2014; Ogo et al., 2014). In Mais wurde zudem die Beteiligung von *ZmNRAMP1* an der Aufnahme von Fe(II) diskutiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ZmNRAMP1* in den Wurzeln von Mais bei Eisenmangel hochreguliert und unter Zugabe von Eisen herabreguliert ist (Nozoye et al., 2013; Zanin et al., 2017).

II.3 Eisentransport innerhalb der Pflanze

Der Eisentransport in der Pflanze gliedert sich in mehrere Schritte. Neben dem radialen Transport von den Wurzelepidermiszellen über den Casparischen Streifen zum Xylem und dem Transport im Xylem selbst, erfolgt der Transport des Eisens ebenso im Phloem und symplastisch innerhalb der Zelle an den Ort des Bedarfs. Darüber hinaus erfolgt auch ein Rücktransport von Eisen aus seneszenten Geweben (Abb. 2). Wegen der geringen Löslichkeit des Eisens und seiner hohen Reaktivität, erfolgt der Transport jedoch in Form von Fe-Chelaten, wobei je nach Umgebung unterschiedliche Chelatoren zum Einsatz kommen (Morrissey und Guerinot, 2009). So bindet Eisen im Xylem bei pH-Werten um 5,5 an Citrat, während bei pH-Werten von ca. 7,5 im Phloem, Nicotianamin (NA) der Hauptchelator des Eisens ist (Curie et al., 2009). Nach der Aufnahme des Eisens aus dem Boden in die Wurzelepidermis wird angenommen, dass es symplastisch als Fe(II)-NA-Komplex möglicherweise entlang eines Diffusionsgradienten zum Xylem transportiert wird (Hell und Stephan, 2003). Im Xylem wird Fe(II) anschließend zu Fe(III) oxidiert und als Fe(III)-Citrat-Komplex durch den Transpirationsstrom im Spross, zu den Sprossgeweben transportiert. Da das Xylem aus toten Zellen besteht, sind Efflux-Transporter nötig, um die Beladung des Citrats mit dem Eisen im Xylem zu ermöglichen (Kobayashi und Nishizawa, 2012). In *Arabidopsis* wird Citrat über den Efflux-Transporter FRD3 (ferric reductase defective 3), einem Transporter der MATE-Familie (multidrug und toxin efflux) in das Xylem transportiert, wobei *FRD3* im Wurzelgefäßsystem exprimiert wird (Green und Rogers, 2004). Bei Eisenmangel wird die Expression von *FRD3* induziert und *frd3* Mutanten zeigen starke Chlorosen (Rogers und Guerinot, 2002). Ohne Citrat findet im Xylem kein effizienter Eisentransport statt, da es wahrscheinlich an den Wänden des Apoplasten präzipitiert, eine Zugabe von Citrat führt jedoch zu einer Erholung des chlorotischen Phänotyps (Durrett et al., 2007). Trotz des ausgeprägten Phänotyps der *frd3* Mutante, ist der Citratgehalt im Xylem lediglich um 40 % reduziert, was auf weitere Citrat-Efflux-Transporter hindeutet. Da angenommen wird, dass FRD3 Citrat in seiner freien Form ohne Eisen in das Xylem transportiert, müsste Eisen separat über andere Efflux-Transporter in das Xylem transportiert werden (Kobayashi und Nishizawa, 2012). Ein potentieller Efflux-Transporter für Eisen ist AtFPN1/AtIREG1 (*Arabidopsis* ferroportin 1/iron regulated 1), welcher in der Plasmamembran lokalisiert wurde. Die Promoteraktivität dieses potentiellen Efflux-Transporters dominiert im Leitgewebe der Wurzel und des Sprosses. Verlustmutanten weisen sowohl auf eisenhaltigem Medium als auch auf

Eisen-Mangelmedium geringere Chlorophyllgehalte auf, was auf eine essentielle Rolle im Eisentransport innerhalb des Sprosses hindeutet (Morrissey et al., 2009).

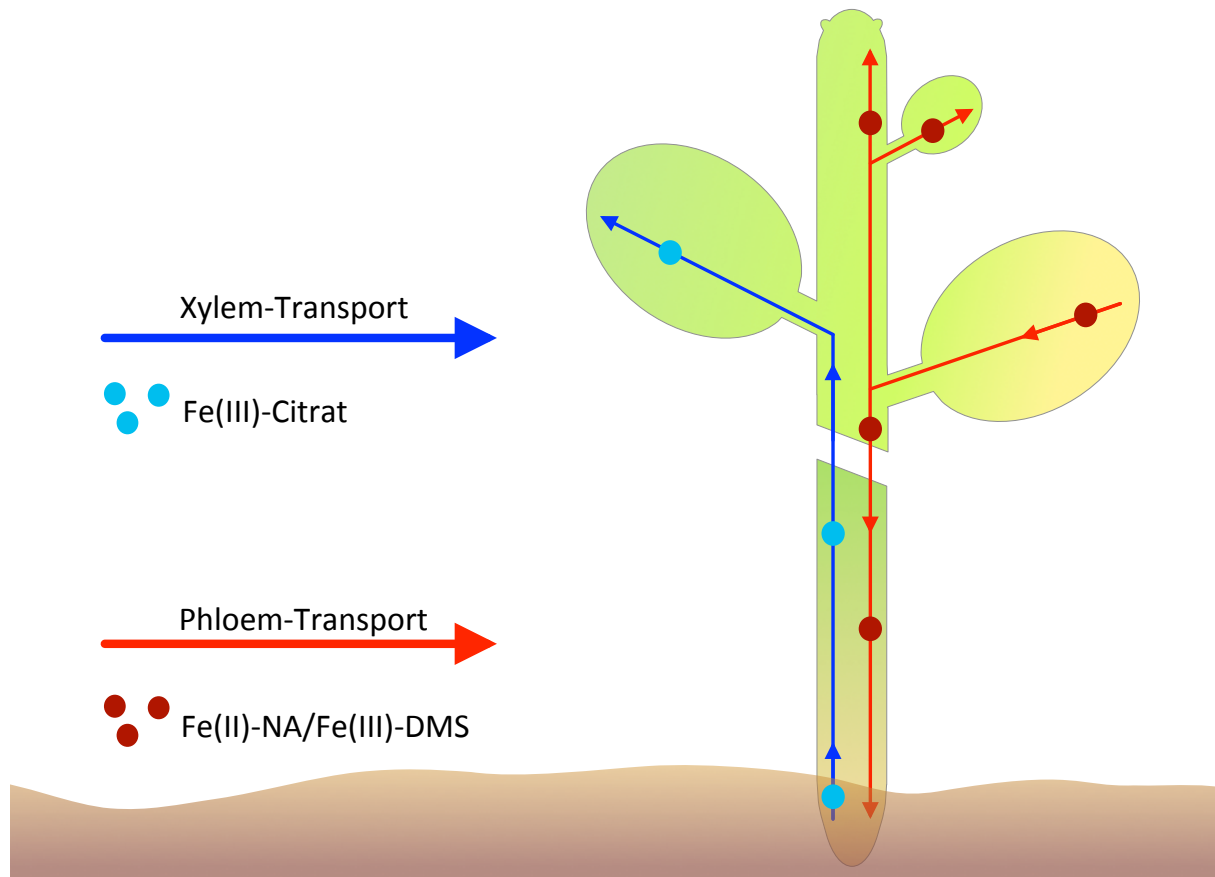


Abbildung 2: Eisen-Transportwege innerhalb der Pflanze.

Der Langstreckentransport von Eisen in Pflanzen gliedert sich in den Xylem-Transport (blau) und den Phloem-Transport (rot). Im Xylem wird Eisen in Form von Fe(III)-Citrat (blaue Kreise) von der Wurzel über den Spross durch den Transpirationsstrom in transpirierende Organe transportiert. Im Phloem erfolgt der Transport von Eisen in Form von Fe(II)-NA (Nicotianamin), aber auch als Fe(III)-DMS (Deoxy-Mugineinsäure); (rote Kreise). Über das Phloem wird Eisen zu transpirationsunabhängigen Organen und Geweben wie jungen Blättern, Sprossmeristemen und Blüten/Samen transportiert, aber auch in der Re-Mobilisierung des Eisens aus seneszenten Blättern spielt der Phloem-Transport eine Rolle.

Für den Eisentransport in transpirationsunabhängigem Gewebe wie Samen und seneszenten Blättern, oder in Geweben ohne ausdifferenziertem Xylem wie Sprossmeristemen, jungen Blättern oder Wurzelspitzen, spielt der Eisentransport über das Phloem eine entscheidende Rolle (Kim und Guerinot, 2007; Curie et al., 2009). Transporter der YSL-Familie sind vermutlich am Transport des Eisens, vom Xylem in das Phloem involviert, wobei diese Eisen, chelatisiert von NA, transportieren (Curie et al., 2009). Nicotianamin wird von allen höheren Pflanzen synthetisiert und bildet sowohl mit Fe(II) als auch Fe(III) Komplexe. Obwohl NA eine höhere Affinität für Fe(III) besitzt, sind die Komplexe mit Fe(II) stabiler und werden bei

höheren pH-Werten, wie sie im Phloem vorherrschen, gebildet (Scholz et al., 1992; von Wirén et al., 1999). Bei Eisenmangel wird in Reis *OsYSL2* verstärkt in Phloemgeleitzellen exprimiert. Über die Expression von *OsYSL2* in Eizellen von *Xenopus laevis* konnte zudem gezeigt werden, dass *OsYSL2* Fe(II)-NA-Komplexe transportiert (Koike et al., 2004). Interessanterweise wird *OsYSL15* bei Eisenmangel in Phloemzellen der Wurzel und Blüten sowie in sich entwickelten Samen exprimiert (Koike et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass *OsYSL15* zwar keine Fe(II)-NA-Komplexe, jedoch aber Fe(III)-Deoxy-Mugineinsäure-Komplexe transportiert und somit im Phloem eine weitere Eisen-Chelat-Transportform existiert (Koike et al., 2004; Inoue et al., 2009). In Reis wurde zudem TOM2 als Efflux-Transporter, der Deoxy-Mugineinsäure vom Cytosol aus der Zelle hinaus transportiert, beschrieben. Dass *TOM2* bei Eisenmangel im Zentralzylinder von Spross und Wurzel, nicht jedoch in der Wurzelexodermis exprimiert wird, deutet auf eine Rolle von TOM2 im Eisentransport innerhalb der Pflanze hin. Dabei ist eine Funktion im Eisentransfer vom Xylem zum Phloem denkbar (Nozoye et al., 2015). Eine Beteiligung von YSL-Transportern an der Re-Mobilisierung des Eisens aus seneszenten Blättern und dem Transport zu Blüten für die Samenbildung, wird ebenfalls diskutiert (Curie et al., 2009). In *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass *YSL1* neben den Blüten, Pollen, jungen Schoten und Embryos, besonders stark in Blattnerven seneszenten Blätter exprimiert wird (Le Jean et al., 2005). Zusätzlich enthielten Samen von *ysl1* Mutanten bedeutend weniger Eisen als Wildtyp-Samen und zeigten eine stark verzögerte Keimung auf Eisenmangel-Medium. Die Zugabe von Eisen konnte dabei die Eisenakkumulation in den Samen nicht wiederherstellen, was auf eine essentielle Funktion von YSL1 im Eisentransport in Samen hindeutet (Le Jean et al., 2005).

Der Transport des Eisens vom Xylem ins Blattgewebe ist bisher noch nicht geklärt, jedoch wird eine Funktion von IRT- und NRAMP-Transportern in diesem Zusammenhang diskutiert. Zusätzlich verdichten sich Hinweise auf eine Beteiligung von YSL-Transportern am Transport des Eisens vom Xylem ins Blattgewebe (Kobayashi und Nishizawa, 2012). So wird angenommen, dass *AtYSL1*, *AtYSL2* und *AtYSL3*, Eisen aus dem Xylem-Transport aufnehmen und es vom Apoplasten in den Symplasten transportieren (DiDonato et al., 2004; Conte und Walker, 2011). *AtYSL2* befindet sich neben der Lokalisation im Gefäßsystem außerdem in Zellen nahe der Blattnervatur in Xylem-assoziierten Zellen und dem Mesophyll. Die Lokalisation von *AtYSL2* ist dabei fast ausschließlich auf laterale Plasmamembranen begrenzt, was einen lateralen Transport von Eisen impliziert (DiDonato et al., 2004). Da bei Eisenmangel die Expression von *AtYSL2* jedoch herabreguliert ist, wird angenommen, dass der Eisentransport in ältere Gewebe aus dem Xylem, zu Gunsten des Eisentransportes in

jüngere Gewebe über das Phloem, unterbunden wird. Dadurch wäre bei kurzzeitigem Eisenmangel die Versorgung der, sich im Wachstum befindenden Gewebe gewährleistet, während ältere Gewebe mit bereits vorhandenen Eisenvorräten vorerst einen Eisenmangel ausgleichen könnten (DiDonato et al., 2004). Vor der Aufnahme des Eisens in Mesophyllzellen ist wohl eine Reduktion des Fe(III) notwendig, wobei Fe(III)-Citrat-Komplexe das bevorzugte Substrat von Fe(III)-Chelat-Reduktasen darstellen (Brüggemann et al., 1993). Tatsächlich konnte bisher der Transport von Fe(II)-NA-Komplexen, jedoch nicht der von Fe(III)-NA-Komplexen durch YSL-Proteine, gezeigt werden (DiDonato et al., 2004; Koike et al., 2004; Gendre et al., 2007; Chu et al., 2010). Die Reduktion von Fe(III) wird dabei vermutlich durch Vertreter der FRO-Transporter-Familie vermittelt, da in *Arabidopsis* *FRO6*, *FRO7* und *FRO8* auch im Sprossgewebe exprimiert werden (Wu et al., 2005). Die *ysl2 Arabidopsis*-Mutante zeigt keinen vom Wildtyp verschiedenen Phänotyp, weshalb von einer Kompensation durch andere Vertreter der YSL-Transporter-Familie ausgegangen wird (DiDonato et al., 2004). Einfachmutanten von *YSL1* und *YSL3* in *Arabidopsis* weisen ebenfalls keinen Eisenmangel-Phänotyp auf. Die *ysl1/ysl3* Doppelmutante in *Arabidopsis* hingegen zeigt chlorotische Interkostalfelder in älteren Blättern, während jüngere Blätter nicht betroffen sind, wobei dieser Phänotyp durch Zugabe von Eisen kompensiert werden kann (Waters et al., 2006). Somit deutet auch der Phänotyp der *ysl1/ysl3* Doppelmutante auf eine Beteiligung der YSL-Transporter im Eisentransport vom Xylem zu Mesophyllzellen hin.

II.4 Eisentransport in Chloroplasten

Beim intrazellulären Eisentransport ist der Transport in Chloroplasten von besonderer Bedeutung. Chloroplasten enthalten 80 – 90 % des Eisens welches sich in Blattzellen befindet und sind somit das eisenreichste Organell in Pflanzenzellen (Terry und Low, 1982). Neben wichtigen Funktionen im Primär- und Sekundärmetabolismus sind Chloroplasten der Ort der Photosynthese, welche das autotrophe Leben der Pflanzen erst ermöglicht. Ein Eisenmangel in Pflanzen äußert sich in Form von Chlorosen und vermindertem Wachstum, was auf einen Eisenmangel in Chloroplasten zurückzuführen ist. Als Resultat einer Endosymbiose von Vorfahren heutiger Cyanobakterien mit Wirtszellen die bereits Mitochondrien enthielten, besitzen Chloroplasten zwei Hüllmembranen (Gould et al., 2008). Um in die Chloroplasten zu gelangen, muss Eisen diese beiden Hüllmembranen passieren. Eine Reihe physiologischer Studien beschäftigte sich mit der Aufnahme von Eisen in Chloroplasten. So wurde an isolierten, intakten Chloroplasten aus Gerste die Aufnahme von $^{59}\text{Fe(III)}$, chelatisiert durch

Epihydroxy-Mugineinsäure gezeigt, wobei der Transport in Abhängigkeit von Licht erfolgte (Bughio et al., 1997). In Erbse wiederum konnte nachgewiesen werden, dass ein, durch einen H^+ -Gradienten stimulierter, einwärtsgerichteter Transport von Fe^{2+} über die innere Chloroplastenhüllmembran (IE = inner envelope) stattfindet (Shingles et al., 2001; Shingles et al., 2002). Dabei wurden die Fe^{2+} -Transportraten in isolierte Vesikel der inneren Hüllmembran gemessen, welche mit dem Fe^{2+} -sensitiven Fluorophor Phen-Green beladen waren. Eisenaufnahmeexperimente mit intakten, isolierten Chloroplasten aus Zuckerrübe zeigten, dass Fe(III)-Citrat gegenüber Fe(II)-Citrat die bevorzugte Eisenquelle für Chloroplasten darstellt. Dabei wird angenommen, dass Eisen in Form von Fe(III)-Citrat lediglich die äußere Hüllmembran von Chloroplasten passiert (Solti et al., 2012).

Proteine, welche die Eisenaufnahme über die äußere Chloroplastenhüllmembran vermitteln, wurden bisher noch nicht identifiziert. Es werden jedoch mögliche Parallelen solcher Proteine zu TonB-abhängigen β -Barrel-Rezeptorkanälen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien wie dem *E. coli* FecA-Kanal für Fe(III)-Citrat oder cyanobakterieller TBDT (TonB-dependent transporter) diskutiert (López-Millán et al., 2016). Dem aktuellen Konzept nach, gelangt Eisen als Fe(III)-Citrat-Komplex über die äußere Chloroplastenhüllmembran in den Intermembranraum, wo es für den weiteren Transport durch die innere Hüllmembran der Chloroplasten zunächst reduziert wird (Abb. 3). Dabei deuten mehrere Hinweise auf einen reduktionsbasierten, durch FRO (ferric-chelate reductase/oxidase) vermittelten Mechanismus, in der chloroplastidären Eisenaufnahme hin. So ist die FRO-Aktivität in intakten Chloroplasten aus Gerste bei Eisenmangel bei Licht induziert und in Dunkelheit gehemmt (Mikami et al., 2011). In Zuckerrübe konnte ein FRO-Protein in der inneren, nicht aber in der äußeren Chloroplastenhüllmembran lokalisiert werden, welches für die Reduktion von komplexiertem Fe(III) zu freiem Fe^{2+} verantwortlich war (Solti et al., 2014). Außerdem bevorzugte das FRO-Protein das bei der Photosynthese gebildete Koenzym NADPH, wofür es gegenüber NADH eine höhere Aktivität aufwies. Die Präferenz des Koenzyms NADPH deutet somit auf eine Abhängigkeit der Eisenaufnahme von der Photosynthese hin (Solti et al., 2014). FRO7 aus *Arabidopsis* ist in der Chloroplastenhülle lokalisiert und *fro7* Mutanten haben eine stark verminderte Fe(III)-Chelat-Reduktase-Aktivität, reduzierte Eisengehalte im Chloroplasten, leiden unter Eisenmangelbedingungen im Sämlingsstadium an starken Chlorosen und sind nicht überlebensfähig (Jeong et al., 2008). Unter Standardbedingungen zeigen *fro7* Mutanten jedoch keinen auffälligen Phänotyp und der Phänotyp unter Eisenmangelbedingungen kann zudem durch Zugabe von Eisen aufgehoben

werden. Zusätzlich wird *FRO7* nur in jüngeren Blättern stark exprimiert, was für weitere Eisenaufnahmesysteme in Chloroplasten spricht (Jeong et al., 2008).

Bisher wurden mehrere Proteine entdeckt, für die eine Beteiligung am Eisentransport über die innere Hüllmembran der Chloroplasten beschrieben wurde (Abb. 3). Das *Arabidopsis*-Protein MAR1/IREG3 (multiple antibiotic resistance 1/iron regulated 3), welches wahrscheinlich Aminoglycosid-Antibiotika in Plastiden transportiert, wurde im Chloroplasten lokalisiert und ist ebenfalls in der Eisenhomöostase involviert (Conte et al., 2009; Conte und Lloyd, 2010). Bei Eisenmangel ist die Expression von *MAR1/IREG3* herabreguliert, eine Überexpression von *MAR1/IREG3* führt hingegen zu Chlorosen. Da die Chlorosen zudem durch Zugabe von Eisen aufgehoben werden können, wird eine mögliche Funktion von MAR1/IREG3 bei der Chelatisierung von Eisen, dessen Lagerung oder Ausscheidung diskutiert (Conte et al., 2009). Aminoglycoside können über einwärtsgerichtete Polyamin-Transportsysteme in eukaryotische Zellen gelangen (Van Bambeke et al., 2000). Das führt zu der Hypothese, dass MAR1/IREG3 als Polyamin-Transportsystem fungiert und somit auch Fe-NA-Komplexe in Chloroplasten transportieren könnte, da Nicotianamin ein Polyamin darstellt (Conte et al., 2009; Conte und Lloyd, 2010). Über einen Abgleich mit cyanobakteriellen Eisentransportergenen, wurde in *Arabidopsis* der in Chloroplasten lokalisierte ABC-Transporter NAP14 (non-intrinsic ABC protein 14) entdeckt (Shimoni-Shor et al., 2010). NAP14 weist dabei Ähnlichkeit zu FutC auf, der ATPase des cyanobakteriellen FutABC-Transporters. Laut der At_CHLORO Datenbank ist NAP14 mit der inneren Chloroplastenhüllmembran assoziiert, was auf eine Anbindung an eine membraninserierte Proteinkomponente hindeutet (Ferro et al., 2010; López-Millán et al., 2016). In *nap14* Mutanten ist die Eisenkonzentration im Sprossgewebe, im Gegensatz zu Wildtyp-Pflanzen, um das 18-fache erhöht und in den Wurzeln um 50 % reduziert. Die *nap14* Mutanten sind komplett chlorotisch, deformiert und bei einer Kultur auf Erde nicht überlebensfähig (Shimoni-Shor et al., 2010). NAP14 wird daher eine Rolle als Untereinheit eines chloroplastidären Eisen-Transportkomplexes oder eine regulierende Funktion in der Eisenhomöostase zugeschrieben. Ein weiteres Protein mit potentieller Beteiligung am chloroplastidären Eisentransport in *Arabidopsis*, ist MFL1 (mitoferritin-like 1) und gehört zur mitochondrialen Carrier-Familie (Tarantino et al., 2011). MFL1 ist in der inneren Chloroplastenhüllmembran annotiert, wurde im Proteom der Chloroplastenhüllmembranen unterschiedlicher Spezies detektiert und hat laut Vorhersagen ein chloroplastidäres Transitpeptid (López-Millán et al., 2016). Außerdem wird *MFL1* hauptsächlich in Rosettenblättern von *Arabidopsis* exprimiert, wobei dessen Expression bei Eisenüberschuss hochreguliert ist. *Arabidopsis*-Verlustmutanten von *MFL1* zeigen hingegen

geringere Eisengehalte in Samen und Blättern als der Wildtyp (Tarantino et al., 2011). Als mögliche chloroplastidäre Eisen-Efflux-Transporter in *Arabidopsis*, wurden die beiden Proteine YSL4 und YSL6 beschrieben. Bei Eisenüberschuss ist die Expression von *YSL4* und *YLS6* hochreguliert, wobei YSL6 bisher in der Chloroplastenhülle lokalisiert werden konnte (Divol et al., 2013). Während sowohl *ysl4* Mutanten als auch *ysl6* Mutanten keinen sichtbaren Phänotyp aufweisen, sind *ysl4/ysl6* Doppelmutanten bei Eisenüberschuss stark im Wachstum gehemmt und haben chlorotische Kotyledonen, wobei sowohl Eisen als auch Ferritin in den Chloroplasten akkumuliert. Eine ubiquitäre Überexpression von *YSL4* und *YSL6* hingegen führt zu erhöhter Sensitivität gegenüber Eisenmangel und einer Reduktion des Eisengehaltes in den Chloroplasten (Divol et al., 2013). Sowohl YSL4 als auch YSL6 werden aber auch mit dem Transport von Metall-Ionen über den Tonoplasten und Membranen des endoplasmatischen Retikulums in Verbindung gebracht (Conte et al., 2013). Das Gen *ZmFDR4* wurde aufgrund seiner verstärkten Expression bei Eisenmangel in Maiswurzeln entdeckt und das Protein ZmFDR4 (*Zea mays* Fe deficiency-related 4) erst kürzlich als Eisentransporter beschrieben (Zhang et al., 2017). ZmFDR4 konnte das Wachstum der Eisenaufnahme-Mutanten in Hefe (*fet3fet4*) wiederherstellen und sowohl durch GFP-Targeting als auch durch Immunoblot-Analysen in der Chloroplastenhülle und den Thylakoiden lokalisiert werden. Die Überexpression von *ZmFDR4* in Tabak führte zu einer erhöhten Anzahl an Chloroplasten pro Zelle. Bei Eisenmangel war zudem der Chlorophyllgehalt in *ZmFDR4* Überexprimierern im Vergleich zum Wildtyp erhöht, wobei die Überexprimierer im Gegensatz zum Wildtyp keine Chlorosen zeigten (Zhang et al., 2017). In isolierten Chloroplasten der Überexprimierer wurden über BPDS-Kolorimetrie (Solti et al., 2012) erhöhte Fe^{2+} -Aufnahmeraten gemessen, weshalb davon ausgegangen wird, dass ZmFDR4 als Eisenimport-Protein fungiert. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass ZmFDR4 allerdings spezifisch für monokotyle Pflanzen ist (Zhang et al., 2017).

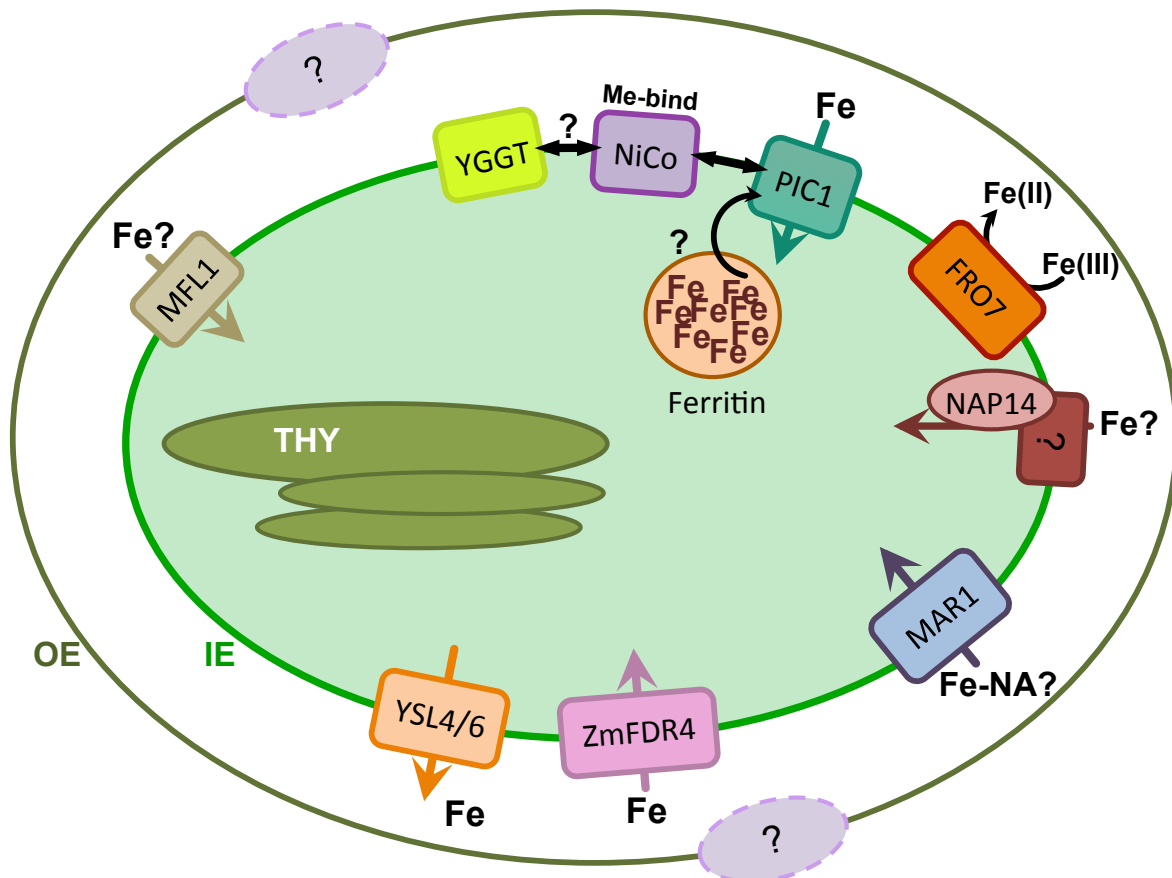


Abbildung 3: Eisentransport in Chloroplasten.

Dargestellt sind potentielle Eisentransporter des Chloroplasten sowie die Eisenpermease PIC1. Alle Proteine sind in der Darstellung in der inneren Chloroplastenhüllmembran (IE) lokalisiert, jedoch wurden bisher nur PIC1, NiCo und YGGT definitiv experimentell im IE lokalisiert. Die Pfeile deuten die mögliche Richtung des Transportes an, wobei nicht immer gesichert ist, ob und in welcher Form Eisen transportiert wird (Fe²⁺/Fe-NA?). Eisentransport-Proteine der äußeren Chloroplastenhüllmembran (OE) wurden bisher nicht identifiziert (angedeutet durch Kreise mit gestrichelter Umrandung und Fragezeichen), jedoch wird davon ausgegangen, dass Fe(III) über den OE in den Intermembranraum gelangt, wo es von FRO7 (ferric-chelate reductase/oxidase 7) zu Fe(II) reduziert wird um dann über den IE transportiert zu werden. Die Permease PIC1 interagiert mit dem Protein NiCo (nickel cobalt transporter), welches eine mögliche Metallbindefunktion ausübt und das Protein YGGT gilt als potentieller, weiterer Interaktionspartner von PIC1 und NiCo. Innerhalb des Chloroplasten wird Eisen im Protein Ferritin gespeichert, wobei eine Korrelation mit PIC1 besteht. Im Chloroplasten sind Thylakoide (THY) dargestellt. Darstellung modifiziert nach López-Millán et al. (2016).

Neben all den potentiellen Eisentransportern der inneren Chloroplastenhüllmembran, wurde PIC1 (permease in chloroplasts 1) als erste Komponente des plastidären Eisentransportes identifiziert (Duy et al., 2007). PIC1 beinhaltet vier α -helicale Transmembrandomänen welche die innere Chloroplastenhüllmembran durchspannen, wobei dessen Lokalisation sowohl durch GFP-Targeting als auch durch Immunoblot-Analysen nachgewiesen wurde (Duy et al., 2007). In *fet3fet4* Hefemutanten konnte PIC1 Defekte in der Eisenaufnahme komplementieren und *PIC1*-Überexprimierer in *Arabidopsis* akkumulieren Eisen in Chloroplasten (Duy et al., 2011). *Arabidopsis PIC1*-Verlustmutanten weisen hingegen einen

stark chlorotischen Phänotyp auf, sind drastisch im Wachstum gehemmt, bei Kultivierung auf Erde nicht überlebensfähig, haben zudem eine gestörte Mesophyll-Organisation und sind in der Chloroplastenentwicklung erheblich beeinträchtigt (Duy et al., 2007). In Tabak (*Nicotiana tabacum*) zeigen *PIC1* "knock down"- und Überexpressionslinien ebenfalls einen vergleichbaren Phänotyp und auch NtPIC1 ist imstande die *fet3fet4* Hefemutante zu komplementieren (Gong et al., 2015). PIC1 steht phylogenetisch cyanobakteriellen Proteinen nahe und hat daher seinen Ursprung in den Proteinen des cyanobakterienähnlichen Endosymbionten, welcher als Vorläufer der Plastiden gilt (Duy et al., 2007). Das Ortholog von PIC1 im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, Sll1656 kann zudem *pic1* Mutanten in Pflanzen funktionell komplementieren und die Eisenaufnahme in *fet3fet4* Hefemutanten wiederherstellen (Duy et al., 2007; Lv et al., 2009). Darüber hinaus kommt es in Chloroplasten von *Arabidopsis pic1* Mutanten zu einer Akkumulation von Ferritin-Clustern welche mit Eisen beladen sind, während *PIC1*-Überexprimierer einen, mit Ferritin-Verlustmutanten bei Eisenüberschuss vergleichbaren Phänotyp aufweisen (Duy et al., 2007; Ravet et al., 2009; Duy et al., 2011). So führt eine *PIC1*-Überexpression zu starken Defekten in der Blüten- und Samenentwicklung, was eine verminderte Samenbildung und reduzierte Keimraten zur Folge hat. Der Eisengehalt in den Blüten ist dabei erhöht, in den Samen jedoch reduziert. In Ferritin-Verlustmutanten sind zudem die *PIC1*-Transkriptlevel im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Ravet et al., 2009). Zwischen der Eisenpermease PIC1 und dem, für die Eisenhomöostase wichtigen Ferritin, scheint somit eine starke Korrelation zu bestehen, was die Rolle von PIC1 in der Eisenhomöostase zusätzlich untermauert (López Millán et al., 2016). Allerdings wurde die Permease PIC1 auch als TIC21 (translocon at the IE membrane of chloroplasts of 21 kDa), einer putativen Untereinheit eines Translocons der inneren Chloroplastenhüllmembran beschrieben, welches möglicherweise am Import kerncodierter Plastidenproteine aus dem Cytosol beteiligt ist (Teng et al., 2006). Es gibt jedoch keine direkten funktionellen Analysen eines Proteinimportes durch PIC1 und eine Akkumulation unprozessierter Vorläuferproteine der Plastiden in *pic1* Mutanten (Teng et al., 2006) konnte nicht bestätigt werden, wohingegen vollständig prozessiertes Ferritin in *pic1* Mutanten akkumuliert (Duy et al., 2007). Die Identifikation eines 1 MDa Proteinkomplexes in der inneren Chloroplastenhüllmembran, welcher das potentielle Translocon TIC20 beinhaltet, führte zu der Annahme, dass auch PIC1 als Bestandteil dieses Komplexes an dessen Peripherie assoziiert sei (Kikuchi et al., 2009). Weitere Analysen zeigten jedoch, dass sich PIC1 nicht zusammen mit dem 1 MDa-Komplex aufreinigen ließ (Kikuchi et al., 2013). Ein weiteres Indiz welches dagegen die Beteiligung von PIC1 am Eisentransport untermauert, ist

die Interaktion mit NiCo (nickel cobalt transporter), einem putativen Metalltransport-Protein (Eitinger et al., 2005; Duy et al., 2011). In *Arabidopsis* sind die beiden NiCo-Proteine NiCo1 und NiCo2 außerdem ebenfalls wie PIC1 in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert (Duy et al., 2011; Dissertation Roland Stübe, 2013). Eine Punktmutation im Gen *Os-ZN* (zebra-necrosis), dem Ortholog von NiCo in Reis (*Oryza sativa*), führte in Abhängigkeit von Licht zu nekrotischen Streifen in den Blättern (Li et al., 2010). NiCo-Proteine enthalten außerdem spezifische Metallbindedomänen, sodass bei einer Interaktion mit PIC1 die Bindung von Eisen durch NiCo vermittelt werden könnte, wobei das Eisen im Anschluss an das Eisentransport-Protein PIC1 übertragen wird (López Millán et al., 2016). Co-immunpräzipitations-Experimente mit PIC1 und NiCo führten außerdem zur Identifikation des Proteins YGGT. Dieses Protein interagiert möglicherweise zusammen mit PIC1 und NiCo innerhalb eines PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes, der den Transport von Eisen über die innere Chloroplastenhüllmembran vermitteln könnte (Dissertation Roland Stübe, 2013). Bakterielle CbiMNQO/NikMNQO ABC-Transporter die Cobalt/Nickel transportieren, weisen dabei gewisse Parallelen zu dem hypothetischen PIC1-NiCo-YGGT-Translocon auf. Diese Transporter bestehen aus den drei transmembranen Untereinheiten CbiQ/NikQ, CbiM/NikM und CbiN/NikN und der löslichen ATPase-Untereinheit CbiO/NikO (Rodionov et al., 2006). CbiQ/NikQ besitzt Bindestellen für die ATPase-Untereinheit und weist somit Parallelen zur Permease PIC1 auf, welche zudem ebenfalls zwei lösliche Helices mit einer möglichen Bindefunktion besitzt (Dissertation Daniela Duy, 2009). Für CbiM/NikM wurde eine Funktion in der Metallerkennung und -bindung nachgewiesen (Kirsch und Eitinger, 2014), wie sie auch für NiCo vorhergesagt wird und YGGT könnte das Pendant zu CbiN/NikN darstellen (Rodionov et al., 2006; Dissertation Roland Stübe, 2013). Für die Bestätigung des hypothetischen PIC1-NiCo-YGGT-Translocons ist allerdings neben einer weiteren Charakterisierung der Untereinheiten, der Nachweis einer Interaktion untereinander unerlässlich.

II.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Um zum besseren Verständnis der pflanzlichen Eisenhomöostase beizutragen, sollten aufbauend auf im Vorfeld gewonnenen Erkenntnissen, im Rahmen dieser Arbeit folgende Ziele erreicht werden:

- (i) Die subzelluläre Lokalisierung und initiale Charakterisierung eines potentiellen Regulators der pflanzlichen Eisenhomöostase in Chloroplasten.
- (ii) Die Untersuchung der Komplexbildung und der Interaktion der Proteine PIC1, NiCo und YGGT über native biochemische Aufreinigung aus der inneren Hüllmembran von Chloroplasten und einen Split-Ubiquitin-Test in Hefe.
- (iii) Die Charakterisierung der *in vivo* Funktion der Proteine PIC1, NiCo1/2 und YGGT-C in der gesamten Pflanze und speziell den Chloroplasten.

III Material

III.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von Biomol GmbH (Hamburg), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), Merck KGaA (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) und Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) bezogen.

III.2 Enzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) und Thermo Fischer Scientific Inc (Waltham Massachusetts, USA) bezogen. Die T4 DNA Ligase sowie die Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase stammten von New England Biolabs GmbH, die Taq-Polymerase von Bioron GmbH (Ludwigshafen) und die M-MLV Reverse Transkriptase von Promega GmbH (Mannheim). RNase freie DNase I wurde von Qiagen GmbH (Hilden) bezogen, RNase von AppliChem GmbH (Darmstadt), Blunting-Enzym von Thermo Fischer Scientific Inc, Cellulase »Onozuka« R10 von Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Macerozym R10 von Yakult Honsha Co. LTD (Tokio, Japan).

III.3 Vektoren und Konstrukte

Folgende Plasmid-Vektoren wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Plasmid Vektoren.

Plasmid-Vektor	Verwendung	Quelle
pBT3-SUC pPR3-N pAL-Alg5 pDL2-Alg5	Split-Ubiquitin-System (DUALmembrane Kit 3)	Dualsystems Biotech AG (Schlieren, Schweiz),
pJET1.2 pCRblunt	Subklonierung	Thermo Fischer Scientific Inc (Waltham Massachusetts, USA)
pB2WG7 pB7GWIWG2 pH7GWIWG2 pOpOff2K	"Silencing" RNAi, konstitutiv RNAi, induzierbar	Plant Systems Biology (University of Gent, Belgien) Australien (https://www.pi.csiro.au/RNAi)

III.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Metabion international AG (Planegg) synthetisiert oder von Thermo Fischer Scientific Inc (Waltham Massachusetts, USA) bezogen (M13fw/M13rev).

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'-3')	Anwendung
hi1 T-DNA fw hi1 T-DNA rev LB1SAIL-tail LBkp0 (SALK) NiCo_SAIL 1055 fw NiCo_SAIL 1055 rev SAIL_1153_D08_LP yggf-c-3_rev	CTCTCTACCAATTTCTCTTCATTTATTTAC TGAGAGAGTTGCATATATATACATGAGAC CAAAAGTGTACCAACAACGCTTTACAGCA CGATTTCCGAACCACCATCAAACAGG TGCAACAGTTCCCAGATTCCGTCAC TTGATACCATGCTGATGTCGTTTC TGATGCATGAATTCTTAAATTTTG GAAGGGAAGGGGTTAAGAGG	Genotypisierung T-DNA Insertionslinien
popOff-INT seq fw popOff-INT seq rev	TGAGCTTTGATCTTTCTTTAACTG TGTTAGAAATTCCAATCTGCTTGTA	Genotypisierung RNAi-Linien
mPIC1(F51C) mPIC1(I53P) mPIC1(V55P/C) mPIC1(V55G) mPIC1 (F51C) exchange mPIC1 (I53P) exchange mPIC1 (V55C) exchange mPIC1 (V55G) exchange mPIC1 (V55P) exchange	CACAGCTGCAACCACAGT AGAATCACAGCTGCAACC AAGGATAGAATCACAGCTG GAAGGATAGAATCACAGCTG ATTCTATCCTGCTCCATTGTTGTAAC ATCCTTCTCCCCTGTTGTAACGGG CTCCATTGTTTGCACTGGGAAACCTACTTC TCCATTGTTGGAACCTGGGAAAC CTCCATTGTTCTACTGGGAAACC	Mutation PIC1 TonB-Box
YSUS-PIC1-recl.-fw YSUS-PIC1-recl.-rev	GTGGCCATTACGGCCATGTCCGTTCCCGGTG GAGGCCGAGGCGGCCGAAGCAACCTTAGGAAC	Umklonierung Prey- zu Bait-Vektor

attB2 HI#1_fw + cacc HI#1_rev-Stop NiCo1 LC fw NiCo2 LC fw OEP7.1 fl fw (CACC) OEP7.1 fl rev (-Stop) OEP7.2 fl -GATE fw OEP7.2 fl -GATE rev mPIC1 (F51C) exchange mPIC1 (I53P) exchange mPIC1 (V55C) exchange mPIC1 (V55G) exchange mPIC1 (V55P) exchange pBT3-N rev	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CACCATGGCGACTTCTACCTTCTTCTCG AGAGAACCAATTAACGAGCTCGTCCGCGTG ACATCAGCATGGTATCAAC CGGAACCATGTGTTGTTAC CACCATGGGAAAACTTCGGGAGCGAAACAG CAAACCCTCTTTGGATGTGGTTGCAG CACCATGGTGGAGAAGTCAGGAGGAG GGCGCCCGACGGGGGAGGGACG ATTCTATCCTGCTCCATTGTTGTAAC ATCCTTCTCCCCTGTTGTAAGTGGG CTCCATTGTTTGCAGTGGGAAACCTACTTC TCCATTGTTGGAAGTGGGAAAC CTCCATTGTTCTACTGGGAAACC AAGCGTGACATAACTAATTAC	"Colony-PCR"
GW-RNAi-INT fw GW-RNAi-INT rev M13fw M13rev pBT3-C for pBT3-C rev pBT3-N rev pOpOff2 seq fw pOpOff2 seq rev	TTTGCAGGTCAGCTTGACACTG CCCCTAAGCGTGACCAGATAAAC GTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC TGGCATGCATGTGCTCTG GTAAGGTGGACTCCTTCT AAGCGTGACATAACTAATTAC CTCAACTTTTATCTTCTTCGTCTTACAC GGGTTCGAAATCGATAAGCTTGCGC	Sequenzierung
At-ACT28_fw At-ACT28_rev ATFE-PbLCfw NiCo2 LCfw NiCo2 LCrev PIC1-LC-rev neu1 YGGT-C LC-1 fw YGGT-C LC-1 rev	GGTGATGGTGTGTCT ACTGAGCACAATGTTAC CTCCGTGGAAGTCCCA CGGAACCATGTGTTGTTAC AGCTACAAAGACTTGACG GGCAGAAACTCAAGC CTAGCTCAGAACTCTCTCTCGC CGTATCGAAGATAGGAGGAATG	Quantitative RT-PCR

III.5 Molekulargewichts- und Größenstandards

In der Agarose-Gelelektrophorese wurde als Größenstandard mit dem Enzym PstI geschnittene DNA des λ -Phagen (Thermo Fischer Scientific Inc (Waltham Massachusetts, USA) verwendet. Für die SDS-PAGE wurde der peqGOLD Protein Marker I (β -Galactosidase [116,0 kDa], Rinderserum-Albumin [66,2 kDa], Ovalbumin [45,0 kDa], Laktat-Dehydrogenase [35 kDa], RE Bsp981 [25 kDa], β -Laktoglobulin [18,4 kDa], Lysozym [14,4 kDa]) von VWR International GmbH (Darmstadt) verwendet. In der BN-PAGE kam der HMW Native Marker (Thyreoglobulin [669 kDa], Ferritin [440 kDa], Katalase [232 kDa], Laktat Dehydrogenase [140 kDa], Albumin [66 kDa]) von GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB) zum Einsatz.

III.6 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet (Tab. 3). Die gegen *Arabidopsis thaliana*- (At) und *Pisum sativum*-Proteine (Ps) gerichteten Antikörper stammen aus Kaninchen und wurden von der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) gewonnen.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper		Quelle
primär	α -AtPIC1 α -PsNiCo α -PsYGGT	Pineda Antikörper-Service (Berlin)
	α -PsTIC110 α -PsTIC20	PD Dr. Bettina Bölter, Department Biologie I, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München
	α -HA-Tag (Maus)	Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
sekundär	α -Maus-IgG Peroxidase	Merck KGaA (Darmstadt)
	α -Kaninchen-IgG alkal. Phosphatase	

III.7 Bakterien- und Hefestämme

Für die Klonierung in *Escherichia coli* Zellen wurde der Stamm TOP 10 (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham Massachusetts, USA) verwendet. Bei der stabilen Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit *Agrobacterium tumefaciens*, kam der Stamm GV3101::pMK90RK (Koncz und Schell, 1986), bezogen von PD Dr. Jörg Meurer (Department Biologie I, Molekularbiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München) und für die transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL1, bezogen von Prof. Dr. Thomas Ott (Department Biologie I, Genetik, Ludwig-Maximilians-Universität München) zum Einsatz. Der Agrobakterien Stamm GV3101 mit dem p19-Helferplasmid zur Unterstützung der transienten Transformation von *Nicotiana benthamiana*, war ein Geschenk von Prof. Dr. Thomas Ott. Der Hefestamm NMY51, welcher für das Split-Ubiquitin-System benutzt wurde, war Bestandteil des DUALmembrane Kit 3 (Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Schweiz).

III.8 Pflanzenmaterial

In allen Experimenten mit *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) wurde der Ökotyp Col-0 (Columbia 0, Lehle seeds, Round Rock, USA) als Wildtyp zur Kontrolle verwendet. Die YGGT-C-T-DNA-Insertionslinie SAIL_1153_D08 sowie die beiden HII-T-DNA-Insertionslinien *hi1#1* (SALK_035430) und *hi1#2* (SALK_035424) wurden von NASC (University of Nottingham, Leicestershire, GB) bezogen. Die RNAi-Linien *pic1* 8.6 und *pic1* 9.9 lagen in der T3-Generation vor und die beiden RNAi-Linien *nico1/2* 4.1 und *nico1/2* 8.6 lagen bereits homozygot in der T4-Generation vor und wurden von Roland Stübe im Rahmen seiner Doktorarbeit (2013) erzeugt. Die RNAi-Kontroll-Linie *luc* war ein Geschenk von Prof. Dr. Iris Finkemeier (Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Pflanzenphysiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster). Die Erbsen (*Pisum sativum*) der Sorte "Arvika" wurden vom Bayerischen Futtersaatbau (Ismaning) bezogen. Der Tabak (*Nicotiana benthamiana*) wurde vor mehreren Generationen ursprünglich von Prof. Dr. Thomas Ott (Department Biologie I, Genetik, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt und vom Gewächshauspersonal angezogen.

IV Methoden

IV.1 Pflanzenphysiologische Methoden

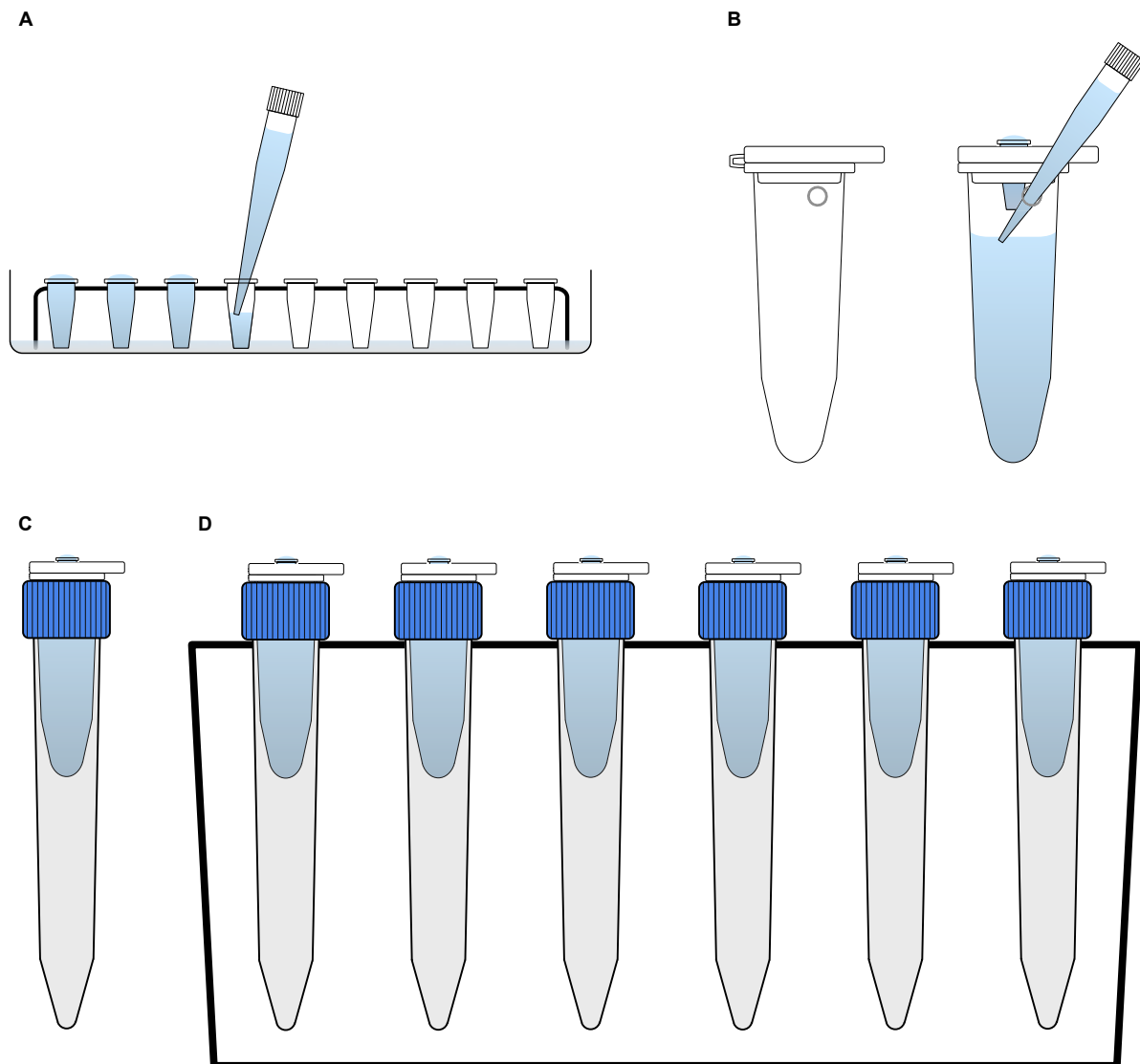
IV.1.1 Anzuchtbedingungen

Für die Aussaat auf Erde wurden die Samen von *Arabidopsis* nicht sterilisiert. Für die Aussaat auf MS-Agarmedium in Petrischalen und der Hydrokultur, wurden die Samen zuvor in einem Exsikkator durch Bedampfung mit sterilisierendem Gas, welches aus 20 ml 12 % Natriumhypochlorid und 1 ml rauchender Salzsäure entstand, für 15 Stunden sterilisiert. Die Samen von Erbse wurden nicht sterilisiert. Die Stratifikation der *Arabidopsis*-Samen auf Erde oder MS-Agarmedium erfolgte für 1-3 Tage, im Dunkeln bei 4°C. Die Anzucht erfolgte im Anschluss in Langtag-Klimakammern mit 16 h Licht ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 21°C und 8 h Dunkelheit bei 16°C. Sobald die *Arabidopsis*-Pflanzen anfangen zu blühen, wurden sie in Gewächshauskammern mit Zusatzbeleuchtung ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) von 06:00 – 20:00 Uhr, bei einem Sollwert von 18°C/14°C (Tag/Nacht), wobei die Lüftungsklappen bei 21°C/14°C (Tag/Nacht) öffneten, gestellt. Die Anzucht von Erbse geschah von der Aussaat an in Gewächshauskammern mit Zusatzbeleuchtung ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) von 06:15 – 21:15 Uhr, bei einem Sollwert von 20°C/17°C (Tag/Nacht), wobei die Lüftungsklappen bei 22°C/21°C (Tag/Nacht) öffneten.

Die Aussaat von *Arabidopsis* erfolgte direkt auf Erde, wobei die Samen direkt mit einem Zahnstocher auf Erde in Töpfen ausgebracht wurde, in denen die Pflanzen verblieben. Die Aussaat von Erbse erfolgte in Anzuchtkisten. Die gewaschenen und vorgequollenen Samen wurden dicht auf Sand ausgesät und mit Vermiculite bedeckt.

Die Aussaat von *Arabidopsis* auf MS-Agarmedium (1 % Saccharose; 0,05 % MES; 0,237 % MS; 0,7 % Plant-Agar, pH 5,8 mit KOH) in Petrischalen, geschah einzeln mit sterilen Zahnstochern oder durch Streuen. Zur Selektion transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen wurde das Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Hygromycin: 50 $\mu\text{g/ml}$; Kanamycin: 100 $\mu\text{g/ml}$) bzw. BASTA (50 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Die Platten wurden nach der Stratifikation in einer Langtag-Klimakammer aufgestellt.

IV.1.2 Anzucht der RNAi-Linien in Hydrokultur

**Abbildung 4: Aufbau der Hydrokultur-Anzucht.**

(A) 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße mit abgeschnittenem Boden stehen mit einem Ständer in einer Petrischale. Zum Befüllen werden diese vorübergehend von unten mit aufgekochtem Agar abgedichtet, und die Reaktionsgefäße anschließend mit Agar-Medium befüllt, bis ein konvexer Meniskus entsteht. (B) In 5 ml Reaktionsgefäße wird knapp unter dem Gefäßrand ein Loch geschmolzen, für ein späteres Transferieren der Deckel auf andere Gefäße, wird die Verbindung zwischen Reaktionsgefäß und Deckel entfernt. Die PCR-Reaktionsgefäße (mitsamt den Pflanzen) werden durch ein Loch im Deckel der 5 ml Reaktionsgefäße, in diese überführt und durch das eingeschmolzene Loch in den 5 ml Reaktionsgefäßen, Nährlösung pipettiert. (C) Die 5 ml Reaktionsgefäße werden durch ein Loch im Deckel von lichtdichten 15 ml Reaktionsgefäßen, in diese überführt. (D) Die 15 ml Reaktionsgefäße werden wiederum durch Löcher im Deckel von lichtundurchlässigen Stapelboxen aus Kunststoff, in diese gestellt.

Die Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen für die Ultrastrukturanalyse erfolgte unter anderem in Hydrokultur (Abb. 4). Für die Aussaat wurde der Boden von 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen abgeschnitten, sodass am Boden eine Öffnung entstand. Diese wurden anschließend in einen Ständer (Haltevorrichtung einer 200 µl Pipettenspitzen-Box) und damit in eine Petrischale

gestellt (Abb. 4A). Um die Gefäße zum Befüllen vorübergehend von unten abzudichten, wurde die Petrischale so weit mit 0,7 % aufgekochtem Agar befüllt, bis die untere Öffnung der PCR-Reaktionsgefäße von Agar umgeben war (Abb. 4A). Nachdem der Agar fest geworden war, wurden die Reaktionsgefäße mit 0,7 % Agar-Medium ohne Zucker (Plant Agar; Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande) so weit befüllt, bis ein konvexer Meniskus entstand. Nach Erstarren und Abkühlen des Agar-Mediums wurde der Ständer mitsamt den Reaktionsgefäßen aus der Petrischale mit dem Agar entnommen und in die zugehörige Pipettenspitzen-Box gestellt. Die Box war mit Nährlösung (MS ohne Zucker) gefüllt, sodass die Reaktionsgefäße in der Lösung hingen. Sterilisierte *Arabidopsis*-Samen wurden mit einem Zahnstocher auf das Agar-Medium ausgebracht (1 Same je PCR-Reaktionsgefäß), die Box mit dem Deckel abgedeckt, mit Parafilm abgedichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert (Tag 0). Am nächsten Tag wurde die Box in eine Langtag-Klimakammer transferiert. Am Tag 8, wenn die Wurzeln der Sämlinge durch die Bodenöffnung der Reaktionsgefäße in die Nährlösung gewachsen waren, wurden die PCR-Reaktionsgefäße mitsamt den Pflanzen durch ein Loch im Deckel von 5 ml Reaktionsgefäßen, in diese überführt (Abb. 4B). In die 5 ml Reaktionsgefäße wurde knapp unter dem Gefäßrand ein Loch geschmolzen, durch welches Nährlösung pipettiert wurde bis die Gefäße voll waren. Für ein späteres Transferieren der Deckel auf andere Gefäße, wurde die Verbindung zwischen Reaktionsgefäß und Deckel entfernt. Die 5 ml Reaktionsgefäße wurden im Anschluss durch ein Loch im Deckel von lichtdichten 15 ml Reaktionsgefäßen, in diese überführt (Abb. 4C) und die 15 ml Reaktionsgefäße wiederum durch Löcher im Deckel von lichtundurchlässigen Stapelboxen aus Kunststoff, in diese gestellt (Abb. 4D). Zur Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit, wurden die Stapelboxen mit lichtdurchlässigen Kunststoffhauben abgedeckt. Die Stapelboxen wurden anschließend in Langtag-Klimakammern gestellt. Alle drei Tage wurde H₂O in die 5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, um den gesunkenen Pegel der Nährlösung wieder anzuheben. Am Tag 16 wurden die Pflanzen mit dem Deckel der 5 ml Reaktionsgefäße in andere 5 ml Reaktionsgefäße überführt, die Nährlösung (MS ohne Zucker) mit Dexamethason (10 µM) oder ohne Dexamethason enthielten. Der Flüssigkeitsstand wurde wieder alle 3 Tage mit H₂O aufrechterhalten. Die Ernte und Fixierung für die Transmissions-Elektronenmikroskopie erfolgte am Tag 21 um 09:00 Uhr, wobei die Pflanzen am Tag zuvor um 17:00 Uhr in lichtdichte Styroporboxen verpackt wurden, um die Stärkesynthese vor der Fixierung zu unterbinden.

IV.1.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte, stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*, erfolgte in Anlehnung an die Methode von Bechthold et al. (1993). Drei Tage vor der Transformation wurden für eine Agrobakterien-Vorkultur 10 ml LB-Medium mit den Antibiotika Rifampicin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und dem Antibiotikum der plasmidvermittelten Resistenz, mit Agrobakterien des Stammes GV3101::pMK90RK die das jeweilige Transformations-Konstrukt enthielten, angeimpft und für 48 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Am Tag vor der Transformation wurden 500 ml LB-Medium (mit den jeweiligen Antibiotika) mit der Vorkultur beimpft und für 24 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Die zu transformierenden 4 - 6 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen (= T0), wurden ebenfalls am Tag vor der Transformation vorbereitet, indem die bereits vorhandenen Schoten entfernt und die Pflanzen anschließend zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit und somit maximalen Öffnung der Stomata, luftdicht in Folie verpackt wurden. Am Tag der Transformation wurden die 500 ml Agrobakterien Kultur für 10 min bei 4°C und 5500xg zentrifugiert und das Pellet in 400 ml Infiltrationsmedium (5 % Saccharose; 0,215 % MS; 0,05 % Silwet L-77) resuspendiert. Die *Arabidopsis*-Blütenstände wurden komplett in die Agrobakterien-Suspension getaucht, welche sich in einem Gefäß in einem Exsikkator befand, und unter Vakuum für ca. 30 sec infiltriert. Die Pflanzen wurden im Anschluss in eine Anzuchtbox gelegt und damit luftdicht in einen Kunststoffbeutel verpackt, im Gewächshaus aufgestellt. Am nächsten Tag wurden die Pflanzen gründlich aber schonend mit Wasser gewaschen und anschließend bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert. Die T1-Samen wurden auf Selektiv-MS-Agarmedium (IV.1.1) auf positive Transformation mit dem Transformations-Konstrukt selektiert.

IV.1.4 Induzierbarer RNAi

Für den induzierbaren RNAi wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen mit den jeweiligen Konstrukten im pOpOff2 Vektor wie unter IV.1.3 beschrieben, transformiert und selektiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 10 µM Dexamethason, wobei es entweder der MS-Nährlösung oder direkt vor dem Gießen dem MS-Agarmedium zugegeben wurde.

IV.1.5 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Am Tag vor der transienten Transformation von *Nicotiana benthamiana*, wurden für eine Vorkultur 3 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum Carbenicillin (100 µg/ml) und dem Antibiotikum der plasmidvermittelten Resistenz, mit Agrobakterien des Stammes AGL1 die das jeweilige Transformations-Konstrukt enthielten, angeimpft und für 24 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die zu transformierenden Tabakpflanzen in einen Kunststoffbeutel gestellt, mit Wasser besprüht und luftdicht verpackt. Mit der Agrobakterien-Vorkultur wurden 30 ml LB-Medium beimpft und für 3 – 4 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei Raumtemperatur (im Folgenden RT) und 3220xg, wonach das Pellet in 30 ml Induktionsmedium (10 mM MES; 10 mM MgCl₂; 200 µM Acetosyringon) resuspendiert und weitere 2 h bei 28°C und 75 rpm inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei RT und 3220xg, wurde das Pellet in Infiltrationsmedium (5 % Saccharose; 200 µM Acetosyringon) resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ (Optische Dichte bei 600 Nanometer) zwischen 0,5 und 0,7 eingestellt. Mit einer Spritze wurden die Tabakblätter durch die Stomata mit der Bakteriensuspension infiltriert, die Pflanzen mit Wasser besprüht und luftdicht in einen Kunststoffbeutel verpackt, über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Pflanzen ohne Kunststoffbeutel im Gewächshaus aufgestellt.

IV.1.6 Isolation von Mesophyllprotoplasten aus *Nicotiana benthamiana*

Für die subzellulären Lokalisationsstudien durch Detektion des GFP-Signals am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS-SP5, Leica, Wetzlar), wurden zwei bis drei Tage nach der transienten Transformation des Tabaks, Mesophyllprotoplasten isoliert. Vor Beginn der Isolation wurden pro Ansatz 10 ml einer Enzymlösung mit 1 % Cellulase »Onozuka« R10 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) und 0,3 % Macerozym R10 (Yakult Honsha Co. LTD, Tokio, Japan) in sterilem F-PIN Puffer hergestellt und für 10 min bei 55°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 0,1 % BSA zugesetzt und die Lösung direkt auf ein halbes, transformiertes Tabakblatt (Durchmesser ca. 7 cm) sterilfiltriert (0,20 µm-Sterilfilter, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Das Blatt wurde mit einer neuen Rasierklinge in Stücke von ca. 5 mm Kantenlänge geschnitten, mitsamt der Enzymlösung in einen 100 ml Vakuumkolben überführt und für ca. 30 sec unter Vakuum infiltriert. Die Blattstücke wurden in der Enzymlösung für 90 min bei RT und 90 rpm im Dunkeln inkubiert, wobei die Protoplasten am Ende der Inkubation durch einminütiges

Schütteln bei 110 rpm und RT freigesetzt wurden. Die Protoplasten-Suspension wurde durch ein Nylonnetz mit 100 µm Maschenweite in ein 15 ml Röhrchen gefiltert, mit 2 ml F-PCN-Lösung überschichtet und durch Zentrifugation für 10 min bei RT und 70xg (geringste Beschleunigung und Bremsung) in einem Ausschwingrotor, pelletiert. Mit einer abgeschnittenen 1ml Pipettenspitze, wurden die intakten Protoplasten vorsichtig zwischen der Enzymlösung und der F-PCN-Lösung entnommen und in 10 ml W5-Puffer gewaschen. Die Protoplasten wurden für 10 min bei 50xg und RT pelletiert, in 1 ml W5-Puffer aufgenommen und konnten anschließend unter dem Mikroskop (Anregungswellenlänge GFP: 488 nm, Emissionswellenlänge: 509 nm; Mikroskop: Leika TCS SP5) untersucht werden.

F-PIN Puffer (500 ml): 10 mM KNO₃; 3 mM CaCl₂; 1,5 mM MgSO₄; 1,3 mM KH₂PO₄; 20 mM NH₄-Succinat; 20 mM MES; 0,5 ml 1000x Micro-MS; 1 ml 500x PC Vitamine; mit ca. 55 g Saccharose auf 550 mOsm eingestellt; pH 5,8 (mit KOH); sterilfiltriert

F-PCN Puffer (500 ml): 10 mM KNO₃; 3 mM CaCl₂; 1,5 mM MgSO₄; 1,3 mM KH₂PO₄; 20 mM NH₄-Succinat; 20 mM MES; 0,5 ml 1000x Micro-MS; 1 ml 500x PC Vitamine; mit ca. 40 g Glucose auf 550 mOsm eingestellt; pH 5,8 (mit KOH); sterilfiltriert

1000x Micro-MS (100 ml): 83 mg KJ; 620 mg H₂BO₃; 2,23 g MnSO₄; 860 mg ZnSO₄; 25 mg Na₂MoO₄; 2,5 mg CuSO₄; 2,5 mg CaCl₂

500x PC Vitamine (100 ml): 10 g Myo-Inosit; 100 mg Pyridoxin-HCl; 50 mg Thiamin-HCl; 100 mg Nicotinsäure; 1 g Biotin; 100 mg Ca-Panthotenat

W5-Puffer: 150 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 2 mM MES; auf 550 mOsm eingestellt; pH 5,8 (KOH); sterilfiltriert

IV.1.7 GUS-Färbung

Nach Aussaat auf MS-Agarmedium wurden die *Arabidopsis*-Sämlinge am 11. Tag geerntet und für 5 min bei RT in Fixierlösung (50 mM Na_iPO₄-Puffer, pH 7,0; 2 % Paraformaldehyd; 0,1 % Glutaraldehyd) inkubiert und mit Na_iPO₄-Puffer (100 ml 50 mM, pH 7,0: 39 ml 0,5 M NaH₂PO₄-Puffer + 61 ml 0,5 M Na₂HPO₄-Puffer) gewaschen. Danach erfolgte die Vakuuminfiltration mit X-Gluc-Lösung (50 mM Na_iPO₄-Puffer; 0,5 mM Kalium-Ferricyanid; 0,5 mM Kalium-Ferrocyanid; 10 mM EDTA; 1 mM X-Gluc). Die Sämlinge wurden im Anschluss für 12 h bei 37°C und Dunkelheit in der X-Gluc-Lösung inkubiert und daraufhin mit 70 % Ethanol entfärbt.

IV.2 Mikrobiologische Methoden

IV.2.1 Medien und Kultur

IV.2.1.1 *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Escherichia coli wurde bei 37°C und 180 rpm in LB-Medium (1 % Pepton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl) kultiviert. Bei der Kultur auf LB-Agarmedium wurden noch 1,5 % Agar zugesetzt. Zur Selektion enthielten die Medien, der Plasmid-codierten Resistenz entsprechende Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin; 100 µg/ml Spectinomycin).

Die Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte bei 28°C und 180 rpm in LB-Medium oder auf LB-Agarmedium. Für die stabile Transformation von *Arabidopsis* wurde der Stamm GV3101::pMP90RK (Koncz und Schell, 1986) eingesetzt, wofür das Medium mit den Antibiotika Rifampicin (100 µg/ml, chromosomale Resistenz), Kanamycin (50 µg/ml, Resistenz durch Ti-Plasmid) und dem entsprechenden Antibiotikum der Transformationsvektor-vermittelten Resistenz, versetzt wurde. Für die transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde *Agrobacterium tumefaciens* des Stammes AGL1 benutzt, wobei zum Medium das Antibiotikum Carbenicillin (100 µg/ml, Resistenz durch das Ti-Plasmid) und das entsprechende Antibiotikum der Transformationsvektor-vermittelten Resistenz, zugegeben wurde. Zur transienten Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde außerdem vereinzelt der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 mit dem p19-Helferplasmid benutzt, zu dessen Medium die Antibiotika Rifampicin (50 µg/ml), Carbenicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben wurden.

IV.2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Für das Split-Ubiquitin-System wurde der Hefestamm NMY51 (MATa his3Δ200 tpr1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)₄-HIS3 ura3::(lexAop)₈-lacZ ade2::(lexAop)₈-ADE2 GAL4) benutzt. Die Kultur erfolgte bei 30°C und 140 rpm in YPD-Medium (1 % Hefeextrakt; 2 % Pepton; 2 % Glucose-Monohydrat) in Schikanekolben. Für die Kultur auf YPD-Agarmedium, wurden dem Medium 2 % Agar zugesetzt.

IV.2.2 Herstellung und Transformation transformationskompetenter Zellen

IV.2.2.1 *Escherichia coli*

Die Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Durch Hitzeschock wurden die Bakterien zur Aufnahme der Plasmid-DNA veranlasst (Maniatis et al., 1982).

IV.2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Herstellung transformationskompetenter Agrobakterien wurden 500 ml LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika (GV3101::pMP90RK: 100 µg/ml Rifampicin; 50 µg/ml Kanamycin; AGL1: 100 µg/ml Carbenicillin) mit Agrobakterien beimpft und für ca. 30 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 4°C und 6000xg pelletiert und in 50 ml TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 6000xg, wurde das Pellet in 20 ml LB-Medium resuspendiert und die Bakteriensuspension in 200 µl Aliquots bei -80°C bis zur Transformation eingefroren.

Für die Transformation wurden 1 – 2 µg Plasmid-DNA zu einem Aliquot Agrobakterien gegeben, dieses für 5 min auf Eis und anschließend für 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert, bevor es für 5 min bei 37°C in einen Heizblock gestellt wurde. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium hinzu pipettiert und die Agrobakterien für 4 h bei 28°C und 700 rpm im Heizblock inkubiert. Nachdem die Bakterien danach für 2 min bei RT und 3220xg pelletiert wurden, wurden sie in 70 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agarmedium mit den jeweiligen Antibiotika, inklusive der Antibiotika entsprechend der Plasmid-Vektor-vermittelten Resistenzen ausgestrichen, wonach sie für 3 Tage bei 28°C inkubiert wurden.

IV.2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Herstellung transformationskompetenter Hefezellen des Stammes NMY51, wurden 50 ml YPD-Medium im Schikanekolben auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,15 beimpft, bei 30°C und 140 rpm kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bis 0,6 für 3 min bei 4°C und 1381xg pelletiert. Die Zellen wurden in 50 ml H₂O gewaschen und wiederum für 3 min bei 4°C und 1381xg pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 12,5 ml LiSorb (100 mM LiOAc; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 M Sorbitol; sterilfiltriert) gewaschen, für

3 min bei 4°C und 1381xg pelletiert und in 300 µl LiSorb resuspendiert. Es wurden 7 µl Carrier-DNA (2 mg/ml Desoxyribonukleinsäure-Natriumsalz Typ III aus Lachssperma, (Merck KGaA, Darmstadt) zugegeben, die Zellen zu 50 µl aliquotiert und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Für die Transformation nach der Lithium-Acetat-Methode von Schiestl und Gietz (1989), wurde ein Aliquot bei RT aufgetaut und währenddessen mit 1 – 2 µg Plasmid-DNA (in 5 µl,) und 300 µl LiPEG (100 mM LiOAc; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 40 % PEG3350; sterilfiltriert) gut vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 35 µl DMSO erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C im Heizblock. Die Zellen wurden anschließend für 2 min bei 4°C und 1100xg pelletiert, in 1 ml 0,9 % NaCl resuspendiert und davon 100 µl auf SD-Selektivmedium (0,7 % Yeast Nitrogen Base; 0,2 % Dropout Mix mit Aminosäuren; 2 % Glucose-Monohydrat; 2 % Bacto-Agar) ausplattiert.

IV.2.3 Split-Ubiquitin-System

IV.2.3.1 Split-Ubiquitin-System auf Interaktions-Kontrollmedium

Transformationskompetente NMY51-Hefezellen wurden in Anlehnung an das Protokoll des DUALmembrane Kit 3 Interaktionstests (Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Schweiz), mit dem Bait-Konstrukt vortransformiert, auf SD –Leu Selektivmedium (SD = synthetic defined) ausplattiert und bei 30°C für 2 – 3 Tage kultiviert. Transformierte Zellen wurden nach IV.2.2.3 wieder kompetent gemacht, mit einem zu testenden Prey-Konstrukt transformiert und sowohl auf dem Transformations-Kontrollmedium SD -2 (-Trp, -Leu) als auch auf dem Interaktions-Kontrollmedium SD -4 (-Trp, -Leu, -His, -Adenin) ausplattiert. Nach einer Inkubation für 3 Tage bei 30°C, wurde die Anzahl der Kolonien auf dem Interaktions-Kontrollmedium prozentual mit der Anzahl der Kolonien auf dem Transformations-Kontrollmedium verglichen. Dem SD-Medium (mit je 5,5 % der Aminosäuren L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, Glycin, Myo-Inositol, L-Isoleucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin und L-Valin, sowie 5 % Uracil und 0,55 % Para-Aminobenzoesäure) wurden dem durchgeführten Experiment entsprechend, 1,2 % Adenin und die Aminosäuren L-Histidin (5,5 %), L-Leucin (9,4 %) und L -Tryptophan (5 %) zugesetzt.

IV.2.3.2 Erstellung von PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Vektor

Für den Test der PIC1 TonB-Box wurden Phenylalanin, Isoleucin und Valin in Cystein, Prolin oder Glycin mutiert. Unter Berücksichtigung des "Codon-Usage" wurden die Codons TGC für Cystein, CCT für Prolin und GGA für Glycin ausgewählt, da diese in der cDNA des Gens *PIC1* die Aminosäuren am häufigsten codierten. Die Mutagenese erfolgte mit dem Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) nach Herstellerangaben, wobei die Aminosäure Exchange-Primer mit der NEB Design Software NEBaseChanger™ entworfen wurden. Es erfolgte eine Annealing-Kontrolle, wobei es erst ab 5+ "Mismatches" zu einem Fehl-Annealing in der PIC1- bzw. der Vektor-Sequenz kam. In der Mutagenese-PCR wurden 25 ng einer Midiprep des Prey-Vektors pPR3-N mit PIC1, bei einer Extensionszeit von 3 min und 24 sec eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zirkularisierung des Mutagenese-PCR-Produkts und die Entfernung des "Templates" in der KLD-Reaktion des Kits, sowie die Transformation in One Shot Top 10 *E. coli* Zellen (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham Massachusetts, USA). Je Ansatz wurden 75 µl auf Selektivmedium (100 µg/ml Ampicillin in LB-Agarmedium) ausplattiert. Nach 24 Stunden bei 37°C wurden Kolonien in einer "Colony-PCR" mit der Primerkombination Exchange-Primer + pBT3-N rev bei einer Annealingtemperatur von 53°C auf positive Transformationsereignisse getestet. Von positiv getesteten Kolonien wurden Minipreps erstellt und mit den Primern pBT3-C fw und pBT3-N rev sequenziert. Bei der Sequenzierungsauswertung wurde neben der allgemeinen Korrektheit der Sequenz insbesondere auf das Vorhandensein der korrekten Mutationen und der NubG-codierenden Sequenz (NubG: N-terminale Hälfte von Ubiquitin mit einer Isoleucin zu Glycin Mutation) geachtet und darauf, ob sich PIC1 und NubG im offenen Leseraster befanden. Die positiv getesteten Minipreps wurden weiter für die Transformation der Hefe im Hefe-Split-Ubiquitin-Test benutzt.

IV.2.3.3 Umklonierung der PIC1 TonB-Box-Mutanten vom Prey- in den Bait-Vektor

Vor der Umklonierung der mutierten *PIC1* Gene vom Prey- in den Bait-Vektor, wurde das Thymin im Basentriplett, welches sich im Anschluss an das 3'-Ende des *PIC1* Gens befand und ein Stop-Codon codierte, durch ein Guanin ausgetauscht. Hierfür wurden die Primer YSUS-PIC1-recl.-fw und YSUS-PIC1-recl.-rev entworfen. In der Mutagenese-PCR wurden Midipreps der Prey-Vektoren mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten auf je 1,4 ng/µl verdünnt und bei einem Aufwand von 5 µl somit 7 ng eingesetzt. Für die PCR wurden je Ansatz

0,3 µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2U/µl) und 5 µl 5x Phusion®-Buffer benutzt, wobei die PCR bei einer Annealingtemperatur von 75 °C, im übrigen nach dem Protokoll unter 3.1 erfolgte. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt, die Banden bei 654 bp ausgeschnitten und die DNA extrahiert (DNA, RNA und protein purification Kit; Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren). Das PCR-Produkt wurde in den PCR-Blunt Vektor kloniert und in diesem anschließend in One Shot Top 10 *E. coli* Zellen transformiert und auf Selektivmedium (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Minipreps von gewachsenen Kolonien wurden zur Kontrolle mit dem Enzym SfiI verdaut und die auf einem 1,5 % Agarosegel positiv getesteten Minipreps, mit den Primern M13fw und M13rev sequenziert. Die Sequenzen wurden auf Vorhandensein der SfiI Enzymschnittstellen und der Korrektheit der dazwischenliegenden PIC1 TonB-Box-Mutanten mit dem ausgetauschten Guanin getestet. Anschließend erfolgte ein Verdau der positiv getesteten Minipreps und einer Midiprep des pBT3-SUC-Vektors mit dem *NiCo2* Gen (zur späteren, besseren Unterscheidung vom *PIC1* Gen), mit dem Enzym SfiI, die Auftrennung des Verdaus auf 1,5 % Agarosegel und die jeweilige DNA-Extraktion aus dem Gel. Die PIC1 TonB-Box-Mutanten-DNA wurde mit dem pBT3-SUC Vektor ligiert, in One Shot Top 10 *E. coli* Zellen transformiert und diese auf Selektivmedium (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Minipreps von gewachsenen Kolonien wurden durch einen Enzymverdau mit SfiI getestet und positive Minipreps mit den Primern pBT3-C fw und pBT3-C rev sequenziert. Von den auf Vorhandensein der TonB-Box-Mutation positiv getesteten und ansonsten korrekten Kolonien wurden Midipreps erzeugt, die für die Transformation der Hefe des Hefe-Split-Ubiquitin-Tests benutzt wurden.

IV.2.3.4.1 β -Galactosidase-Assay

Für den β -Galactosidase-Assay mussten die Hefen in SD -2 Medium bei der gleichen Wachstumsrate geerntet werden um eine vergleichbare Expression der Bait- und Prey-Konstrukte zu gewährleisten. Um die maximale Wachstumsrate der Hefen und somit den optimalen Erntezeitpunkt zu ermitteln, wurde in vier unabhängigen Ansätzen SD -2 Medium auf eine OD₅₆₄ von 0,023 mit Hefen des Bait-Prey-Paares PIC1/PIC1 beimpft, bei 30 °C schüttelnd inkubiert und über einen Zeitraum von 24 Stunden alle 60 Minuten die OD₅₆₄ gemessen. Der Zeitpunkt einer jeden Messung wurde gegen den zugehörigen OD₅₆₄ Wert aufgetragen (Abb. 5).

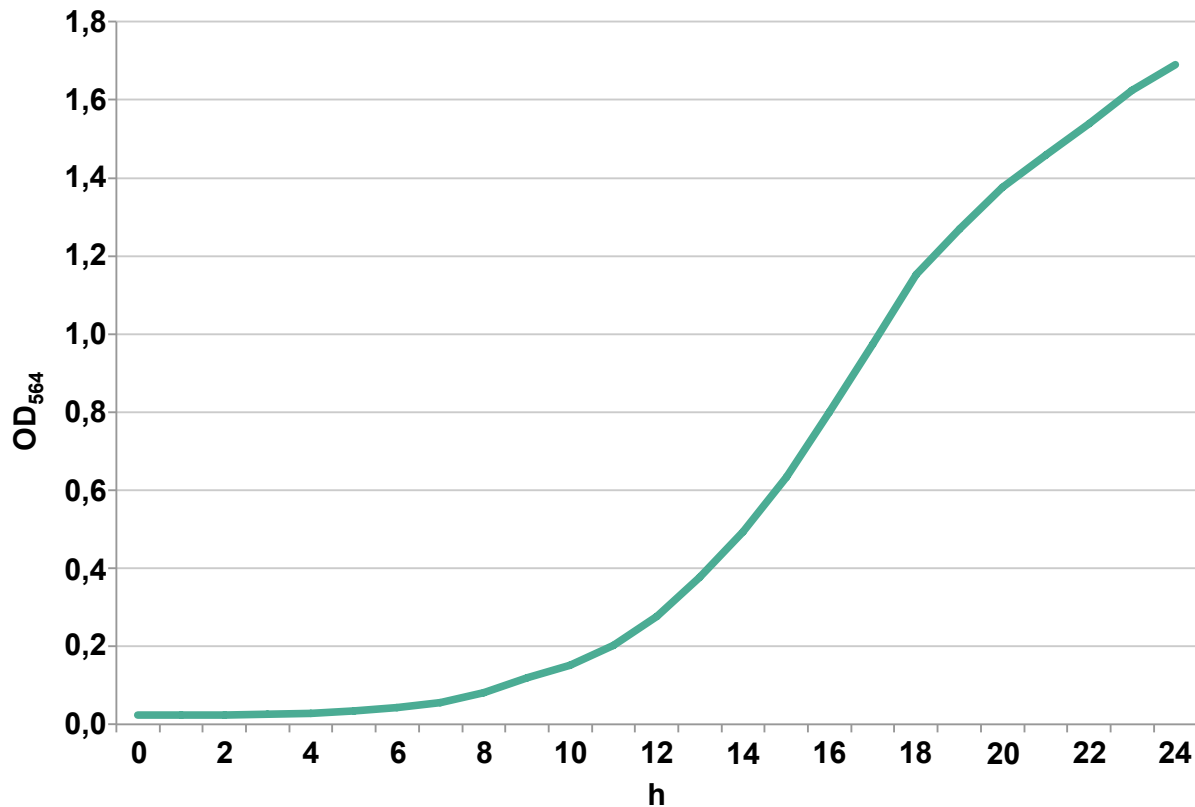


Abbildung 5: Hefe-Wachstumskurve.

Optische Dichte bei 564 nm (OD_{564}) von Hefen des Bait-Prey-Paares PIC1/PIC1, gemessen alle 60 Minuten über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Der lineare Bereich der Wachstumskurve und somit die maximale Wachstumsrate befand sich bei einer OD_{564} um ca. 0,8. Dieser Wert war nach 16 Stunden Wachstum erreicht, weshalb der optimale Erntezeitpunkt für den β -Galactosidase-Assay auf eine OD_{564} von 0,75 festgesetzt wurde. Die Durchführung des β -Galactosidase-Assays erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Möckli und Auerbach (2004). Hierfür wurden 35 ml SD -2 Medium in einem 50 ml Röhrchen mit frischen Hefekolonien von einer SD -2 Platte auf eine OD_{546} von ca. 0,023 beimpft. Die Hefen wuchsen für ca. 15,5 Stunden bei 30°C und 145 rpm, bis sie bei einer OD_{546} von 0,75 geerntet wurden. Hierfür wurden 1,25 Absorptions-Einheiten (1,25 ml bei OD_{546} von 1) bei 4°C für 5 min bei 1700xg abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Für jede Probe wurden je 2x 1,25 Absorptions-Einheiten geerntet, wobei die eine für die Messung der β -Galactosidase-Aktivität und die andere für die Quantifizierung der Prey-Konstrukt-Expression über Immunodetektion benutzt wurde. Sobald alle Proben geerntet wurden, erfolgte der Zellaufschluss in zwei Gefrier-Tau Zyklen durch Einfrieren für 3 min in Flüssigstickstoff und Auftauen für 3 min im Heizblock bei 37°C.

IV.2.3.4.2 Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

Für die Messung der β -Galactosidase-Aktivität wurden bei 4°C 1,25 Absorptions-Einheiten in 25 μ l H₂O resuspendiert, davon 20 μ l (= 1 Absorptions-Einheit) in eine Vertiefung einer 96-Well Platte überführt und 100 μ l PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4) mit X-Gal (500 μ g/ml) und β -Mercaptoethanol (0,05 % v/v) zugegeben. Die Messung der β -Galactosidasekinetik erfolgte am FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, Californien, USA; freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Geigenberger, Department Biologie I, Pflanzenmetabolismus, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt) bei 650 nm über einen Zeitraum von 3 Stunden, wobei alle 60 Sekunden gemessen wurde. Zwischen jeder Messung wurden die Proben geschüttelt. Es wurde ein Intervall ausgewählt, in dem die Steigung aller Proben linear war und die Steigung (Anstieg mOD₆₅₀/60 sec) ermittelt. Der Leerwert wurde von allen Proben subtrahiert, der Wert der Negativkontrolle gleich 0 und der Wert der Positivkontrolle gleich 100 % gesetzt.

IV.2.3.4.3 Quantifizierung der Prey-Konstrukt-Expression über Immunodetektion

Um sicherzustellen, dass die Expression der Prey-Konstrukte in allen Hefen auf vergleichbarem Level abläuft und es nicht aufgrund extremer Expressionsunterschiede zu Fehlinterpretationen kommt, beinhaltet das Prey-Konstrukt ein HA-Tag (human influenza hemagglutinin), über das mittels Immunodetektion dessen Expression quantifiziert werden kann. Hierfür wurden die 1,25 Absorptions-Einheiten aus IV.2.3.4.1 in 100 μ l 1x Laemmlipuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % Glycerin; 2,25 % SDS; 5 % β -Mercaptoethanol; eine Spatelspitze Bromphenolblau) resuspendiert, für 3 min bei 95°C denaturiert und je 15 μ l über eine 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und diese über Nacht bei 4°C mit einer 1:500 Verdünnung des monoklonalen α -HA-Tag (Maus) Antikörpers (Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) in Magermilch-Puffer (3 % Magermilchpulver; 0,1 % BSA; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl) inkubiert. Die zweite Inkubation erfolgte mit einer 1:8000 Verdünnung des α -Maus-IgG Peroxidase Antikörpers für 75 min bei Raumtemperatur. Die Signale wurden anschließend am ECL-Reader detektiert und die Intensität der spezifischen Banden mit der ImageQuant TL Software (GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) gemessen. Abbildung 6 zeigt exemplarisch einen Immunoblot der Hefen mit PIC1 im Bait-Konstrukt und den Kontrollen (-, +), sowie PIC1 im Prey-Konstrukt.

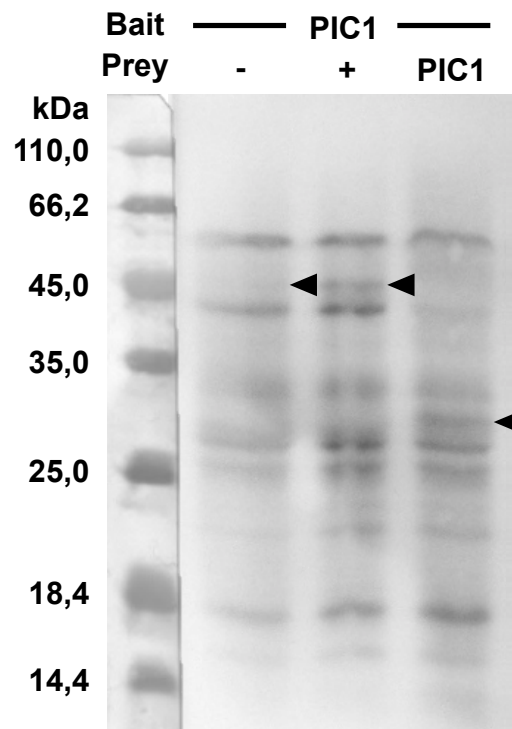


Abbildung 6: Quantifizierung der Prey-Konstrukt-Expression über Immunodetektion des HA-Tags.

Immunodetektion der spezifischen Banden der Kontrollen (-, +) sowie von PIC1 im Prey-Konstrukt, mit einem gegen das HA-Tag gerichteten Antikörper. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Banden der Kontrollen sowie des PIC1 Prey-Proteins.

Die Proteine der Kontrollen inklusive des HA-Tags haben eine Größe von ca. 45 kDa und das Protein PIC1 inklusive HA-Tag hat eine Größe von ca. 29 kDa (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>). Im Falle der Positivkontrolle und für PIC1 im Prey-Konstrukt waren die spezifische Banden jedoch äußerst schwach, während die Bande der Negativkontrolle im Prey-Konstrukt kaum wahrnehmbar war. Neben den spezifischen Banden traten darüber hinaus einige unspezifische Banden auf, die teilweise relativ stark ausgeprägt waren. Dieser Test befand sich allerdings noch in einer sehr frühen Phase und bedarf weiterer Modifikation um die Hintergrundsignale zu minimieren, da sich die spezifischen Banden nicht sinnvoll auswerten ließen. Der β -Galactosidase-Assay wurde daher vorerst ohne Quantifizierung der Prey-Konstrukt-Expression durchgeführt.

IV.3 Molekularbiologische Methoden

IV.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA Fragmente zur Klonierung in Plasmid-Vektoren, zur Genotypisierung oder zum Nachweis positiver Transformation von Bakterien ("Colony-PCR") wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (Saiki et al., 1988), wobei die DFS-TAQ DNA Polymerase (Bioron) und der zugehörige Puffer benutzt wurden. Die PCR wurde in Ansätzen von 25 µl (2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,8 µM Primer fw; 0,8 µM Primer rev; 1 U/25 µl Taq) durchgeführt und durchlief zwischen einer Denaturierung für 3 min bei 95°C und einer End-Elongation für 3 min bei 72°C, 35 Zyklen folgenden Aufbaus: 45 sec bei 95°C (Denaturierung), 45 sec bei der jeweiligen Annealing-Temperatur der Primer, 1 min bei 72°C (Elongation). Für die Genotypisierung und "Colony-PCR" wurden die Primer-Kombinationen wie in Tabelle 4 benutzt.

Tabelle 4: Oligonukleotidprimer-Kombination für die Genotypisierung und "Colony-PCR".

Name fw rev		Annealing Temp. in °C	Anwendung
NiCo_SAIL 1055 fw	NiCo_SAIL 1055 rev	54	Genotypisierung T-DNA-Insertionslinien <i>nico1</i>
SAIL_1153_D08_LP	yggt-c-3_rev	50	<i>yggt-c</i>
LB1SAIL-tail	yggt-c-3_rev	50	
hi1 T-DNA fw	hi1 T-DNA rev	60	<i>hi1#1, hi1#2</i>
hi1 T-DNA fw	LBkp0 (SALK)	60	
popOff-INT seq fw	popOff-INT seq rev	54	Genotypisierung RNAi-Linien
HI#1_fw + cacc	HI#1_rev-Stop	65	"Colony-PCR" GFP-Konstrukte HI#1 OEP7.1 OEP7.2 NiCo1 NiCo2
OEP7.1 fl fw (CACC)	OEP 7.1 fl rev (-Stop)	60	
OEP7.2 fl -GATE fw	OEP7.2 fl -GATE rev	60	
NiCo1 LC fw	attB2	50	
NiCo2 LC fw	attB2	50	

IV.3.2 Klonierungsstrategien

DNA-Gelelektrophorese, Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Ligation von DNA erfolgten nach Maniatis et al. (1982) sowie nach Angaben der Enzymhersteller. Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem DNA, RNA und Protein purification Kit (Macherey-Nagel GmbH und Co. KG). Die Durchführung der LR-Rekombination mit dem GATEWAY System (Thermo Fischer Scientific Inc) geschah nach Herstellerangaben. Die "Blunting"-Reaktion und Ligation in den pJET1.2/blunt Vektor erfolgte nach Protokoll des CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham Massachusetts, USA).

IV.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *Escherichia coli* Zellen, erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Zhou et al. (1990) durch alkalische Lyse mit SDS und NaOH aus 3 ml Übernachtskulturen. Hochreine Plasmid-DNA wurde mit den DNA, RNA und Protein Purification Kits von (Macherey-Nagel GmbH und Co. KG) nach Herstellerangaben isoliert.

IV.3.4 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis*, wurden ein bis zwei junge Rosettenblätter bzw. Sämlinge ohne Wurzeln in 450 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS; 100 µg/ml RNase) mit einer Kugelmühle (TissueLyser, Qiagen GmbH, Hilden) für 3 min bei einer Frequenz von 30/sec, homogenisiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Das Homogenisat wurde anschließend bei Raumtemperatur für 10 min bei 11700xg zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl, -20 °C kaltem Isopropanols erfolgte nach kurzem "Vortexen", für 5 min die Fällung der DNA. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 11700xg wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 500 µl -20°C kaltem, 70 % Ethanol während mehrmaligem Invertierens des Reaktionsgefäßes, gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 11700xg, der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde für baldigen Gebrauch in 50 µl H₂O und für längere Lagerung in 50 µl Tris (10 mM, pH 8,0) gelöst und bei -20 °C gelagert. Zur Genotypisierung wurden in einem PCR-Ansatz (25 µl) 5 µl DNA eingesetzt.

IV.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch am NanoPhotometer Pearl (Implen GmbH, München). Die Absorption einer verdünnten Probe wurde bei 260 nm und 320 nm gemessen und im Anschluss die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ automatisch berechnet. Um eventuelle Verunreinigungen mit Proteinen festzustellen, wurde außerdem die Absorption der Probe bei 280 nm gemessen, wobei das Verhältnis E_{260}/E_{280} bei reinen Nukleinsäuren 1,8 beträgt.

IV.3.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Präparationen und PCR-Produkten, erfolgte durch den Sequenzierservice des Departments Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität München mit den Oligonukleotidprimer-Kombinationen in Tabelle 5.

Tabelle 5: Oligonukleotidprimer-Kombinationen zur Sequenzierung.

Name		Verwendung
fw	rev	
		Sequenzierung
pOpOff2 seq fw	pOpOff2 seq rev	RNAi-Konstrukte
M13fw	M13rev	mPIC1 in PCR blunt Vektor
pBT3-C for	pBT3-C rev	Split-Ubiquitin-System Bait-Konstrukt
pBT3-C for	pBT3-N rev	Split-Ubiquitin-System Prey-Konstrukt
GW-RNAi-INT fw	GW-RNAi-INT rev	HI#1 Antisense- und RNAi-Konstrukte

IV.3.7 RNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolation der RNA aus *Arabidopsis thaliana*, wurden je ein junges Rosettenblatt bzw. mindestens zehn Sämlinge geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. Die Isolation erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden) nach Protokoll des Herstellers.

IV.3.8 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte in einem Ansatz von 10 µl und einem Aufwand von 0,5 – 1 µg RNA unter Verwendung von 4 µm oligo-dT Primer, 0,5 mM dNTP und 2 Units der M-MLV Reversen Transkriptase (Promega GmbH, Mannheim). Die RNA, Primer und dNTP wurden in 1x Reverse Transkriptase-Puffer aufgenommen und für 2 min bei 70°C und im Anschluss auf Eis inkubiert. Nach Zugabe der Reversen Trankriptase folgte eine Inkubation bei 42°C für 90 min

IV.3.9 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Für die quantitative Echtzeit-RT-PCR (PCR auf revers transkribierter RNA) wurde eine 1:20 Verdünnung der cDNA eingesetzt, nach Herstellerangaben die PCR mit dem FastStart DNA Master SYBR-Green Plus Kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) angesetzt und in Glaskapillaren (Roche Diagnostics GmbH) pipettiert. Die PCR erfolgte im LightCycler (Roche Diagnostics GmbH) und durchlief 45 Zyklen mit folgendem Aufbau: 1 sec bei 95°C (Denaturierung), 7 sec bei 49°C (Annealing), 19 sec bei 72°C (Elongation) und 5 sec bei 95°C (Denaturierung). Folgende Kombinationen der Oligonukleotid-Primer wurden für die Amplifikation der jeweiligen, spezifischen PCR-Produkte verwendet: PIC1: AtFe-PbLCfw / PIC1-LC-rev neu1; NiCo2: NiCo2LCfw / NiCo2LCrev; YGGT-C: YGGT-C LC-1 fw / YGGT-C LC-1 rev. Zur Quantifizierung wurden die Ergebnisse mit den in den Proben enthaltenen Ausgangsmengen an Aktin normalisiert, wofür zusätzlich PCR-Produkte des Aktin AtACT2 (At3g18780) jeder Probe, mit dem Primerpaar At-ACT28_fw / At-ACT28_rev amplifiziert wurden. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer Probe wurde anhand folgender Beziehung errechnet:

$$\text{Relativer Gehalt an cDNA} = 2^{[n(\text{Aktin}) - n(\text{Gen})]}$$

Hierbei bezeichnet n die Anzahl der Zyklen bei welcher die Menge des jeweiligen Amplifikats einen festgelegten Schwellenwert überstieg, wobei dieser Schwellenwert bei allen miteinander verglichenen Proben identisch war. Die Messpunkte für die Schwellenwerts-Bestimmung lagen dabei innerhalb der exponentiellen Phase der PCR.

IV.4 Biochemische Methoden

IV.4.1 Isolierung von Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten

Die getrennte Isolierung von äußeren und inneren Hüllmembranen intakter Chloroplasten von Erbse (*Pisum sativum*) erfolgte nach der Methode von Waegemann et al. (1992). Ausgangsmaterial waren Blätter von 10 Tage alten Erbsen, die gemäß IV.1.1 im Gewächshaus angezogen wurden.

IV.4.2 Nachreinigung innerer Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten

Insgesamt ca. 1 ml innerer Hüllmembranfraktionen (IE) aus Erbsenchloroplasten mehrerer Isolierungen wurden gepoolt, zweigeteilt und mit Na_iPO_4 -Puffer (100 ml 0,5 M, pH 7,5: 16 ml 0,5 M NaH_2PO_4 -Puffer + 84 ml 0,5 M Na_2HPO_4 -Puffer) auf ein Volumen von je 1 ml aufgefüllt. Je ein Aliquot wurde auf 34 ml eines linearen Saccharosegradienten (0,6 - 1,2 M; 0,01 M Na_iPO_4 -Puffer, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8) pipettiert und für 16 h bei 4°C und 27000 rpm in einem SureSpin™ 630 Ausschwingrotor (Thermo Fischer Scientific Inc) ohne Bremsung zentrifugiert. Die IE-Bande (bei ca. 0,9 M des Saccharosegradienten) wurde mit einer 1 ml Pipette abgenommen, zum Aufkonzentrieren in 30 ml Na_iPO_4 -Puffer aufgenommen, für 1 h bei 4°C und 27000 rpm in einem SureSpin™ 630 Ausschwingrotor zentrifugiert und das Pellet in 500 µl Na_iPO_4 -Puffer aufgenommen.

IV.4.3 Native Fraktionierung von inneren Hüllmembranen aus Erbsenchloroplasten

IV.4.3.1 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Solubilisierung wurde ein Volumen der Suspension nachgereinigter IE das 300 µg Protein entsprach, für insgesamt 30 min in Intervallen von 3 min mit 0,1 % Dodecyl-β-D-Maltosid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) in ME-Puffer (25 mM MOPS; 1 mM EDTA; pH 7,6) vorsichtig auf Eis auf und ab pipettiert. Die IE wurden anschließend auf einen linearen Saccharosegradienten (10 – 50 % in ME-Puffer; 0,05 % Dodecyl-β-D-Maltosid) pipettiert und für 16 h bei 4°C und 27000 rpm in einem SureSpin™ 630 Ausschwingrotor (ohne Bremsung) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient mit einer 1 ml Pipette in 12 Fraktionen unterteilt und mit Amicon Ultra Centrifugal Filters (0,5 ml, 3K; Merck KGaA) auf 50 µl konzentriert, anschließend dreimal mit 0,05 % Dodecyl-β-D-Maltosid in ME-Puffer gewaschen und letztendlich auf 25 µl

aufkonzentriert. Zum IE-Konzentrat wurden in einem frischen Reaktionsgefäß 35 µl ME-Puffer und 20 µl 4x Laemmli-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40 % Glycerin; 9 % SDS; 20 % β -Mercaptoethanol; eine Spatelspitze Bromphenolblau) zugegeben, die IE für 2 min bei 95°C denaturiert und je 10 µl jeder Fraktion über eine SDS-PAGE gemäß IV.4.4 aufgetrennt.

IV.4.3.2 "Blue-Native" Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Zur Probenvorbereitung wurde ein Volumen der Suspension nachgereinigter IE das 5 µg Protein entsprach, mit Na_iPO_4 -Puffer (100 ml 0,5 M, pH 7,5: 16 ml 0,5 M NaH_2PO_4 -Puffer + 84 ml 0,5 M Na_2HPO_4 -Puffer) auf ein Volumen von 350 µl aufgefüllt, für 10 min bei 4°C und 256000xg pelletiert und in 11,56 µl Solubilisierungspuffer (750 mM Aminocapronsäure; 50 mM BisTris; pH 7) resuspendiert. Nach Zugabe von 1,36 µl 10 % Dodecyl- β -D-Maltosid und 0,68 µl 100 mM MgCl_2 wurden die IE für 15 min in Intervallen von 3 min vorsichtig auf Eis auf und ab pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 256000xg, wonach der Überstand abgenommen und mit 1,36 µl 10x Probenpuffer (500 mM Aminocapronsäure; 10 % Glycerol; 5 % Coomassie G-250) versetzt wurde. Die Probe wurde elektrophoretisch bei 4°C über eine lineare BN-PAGE von 5 – 16 % Acrylamid nach Wittig et al. (2006) aufgetrennt. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid betrug 49,5:3. Die Acrylamid-Konzentration im Sammelgel betrug 3,5 %. Das Gel (1. Dimension) wurde in vertikale Streifen mit einer Laufspur pro Streifen geschnitten und ein Gelstreifen für die elektrophoretische Auftrennung der IE-Proteine auf einer SDS-PAGE (2. Dimension) equilibriert. Dafür wurde der Streifen für 15 min schüttelnd in SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1 % SDS) mit 10 mM β -Mercaptoethanol und anschließend 15 min schüttelnd in SDS-Laufpuffer ohne β -Mercaptoethanol inkubiert, wobei der letzte Schritt für weitere 5 min mit frischem SDS-Laufpuffer wiederholt wurde. Der so equilibrierte Gelstreifen wurde horizontal über dem SDS-Sammelgel platziert und die darin enthaltenen Proteine über eine SDS-PAGE gemäß IV.4.4 aufgetrennt.

IV.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch in einem denaturierenden Gel nach Laemmli (1970). Die Acrylamid-Konzentration betrug 12,5 % und das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid 30:1. Für das Sammelgel wurde 0,375 M Tris-HCl, pH 6,8 und für das Trenngel 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 verwendet. Für die Auftrennung von relativ kleinen Proteinen wie PsYGGT (15,34 kDa), wurde in einer modifizierten Variante der SDS-PAGE nach Schägger (2006) verfahren. Hierfür wurde zum Ansetzen des Gels ein Gelpuffer (3,0 M Tris-HCl, pH 8,45; 0,3 % SDS) benutzt. Für das Trenngel (33,2 % Gelpuffer, 12,5 % Acrylamid; 12,7 % Glycerin; 0,09 % Temed; 0,3 % APS) und das Sammelgel (25 % Gelpuffer; 4 % Acrylamid; 0,2 % Temed; 1,5 % APS) wurde Acrylamid mit einem Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid von 30:1 verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit Anodenpuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 8,9) und Kathodenpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,25; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS) bei einer Spannung von 100 V zuerst bei RT bis die Proben das Trenngel erreicht hatten und anschließend bei 4°C bis die Laufmittelfront das Gel-Ende erreicht hatte.

IV.4.5 Immunodetektion von Proteinen

IV.4.5.1 Elektrotransfer von Proteinen

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (GE Healthcare Chalfont St Giles, GB) auf eine PVDF-Membran (Transmembran Immobilon-P, 0,45 µm; Merck KGaA) übertragen. Für den Transfervorgang wurden von der Anode ausgehend, drei mit Anodenpuffer I (300 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,4) getränkte Whatman-Filterpapiere, zwei in Anodenpuffer II (30 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,4) getränkte Whatman-Filterpapiere und darauf die in Methanol aktivierte und in Anodenpuffer II gewaschene PVDF-Membran gelegt. Das SDS-Gel wurde in Anodenpuffer II geschwenkt, auf die PVDF-Membran gelegt und von drei in Kathodenpuffer (25 mM Tris; 40 mM Aminocapronsäure; 20 % Methanol; pH 7,6) getränkten Whatman-Filterpapieren bedeckt. Die Filterpapiere und die PVDF-Membran hatten dabei exakt die Ausmaße des SDS-Gels und alle Schichten dieses Aufbaus berührten sich unmittelbar ohne Lufteinschlüsse dazwischen. Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche.

IV.4.5.2 Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch die Bindung polyklonaler Antikörper an die Proteine und darauf folgender Detektion über enzymgekoppelte, sekundäre Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelt an α -Kaninchen-IgG oder ECL-Peroxidase gekoppelt an α -Maus-IgG). Die PVDF-Membranen wurden für 30 min bei RT in Magermilch-Puffer (3 % Magermilchpulver; 0,1 % BSA; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl) geschüttelt, in TTBS (0,1 % BSA; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,2 % Tween 20) gewaschen und schüttelnd über Nacht bei 4°C in Verdünnungen (1:500 – 1:5000) des primären Antikörpers in (TTBS bzw. Magermilchpuffer) inkubiert (Details siehe Tabelle 6). Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in TTBS gewaschen und für 45 min bei RT in einer Verdünnung des sekundären Antikörpers mit TTBS (alkalische Phosphatase 1:6000; ECL-Peroxidase 1:8000), inkubiert. Nach zwei Waschschritten für je 2 min in TTBS und zwei Waschschritten für je 2 min in H₂O erfolgte die Detektion. Die Membran wurde für die Färbereaktion durch die alkalische Phosphatase in DIG-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl₂) unter Zugabe von 13,3 μ l/ml BCIP (12,5 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat in 100 % Dimethylformamid) und 6,6 μ l/ml NBT (50 mg/ml 4-Nitrotetrazolium-chloridblau in 70 % Dimethylformamid) inkubiert. Die Färbereaktion wurde in 50 mM EDTA abgestoppt. Für die Detektion durch ECL (enhanced Chemiluminescence) wurden die ECL-Lösungen 1 (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Cumarinsäure) und 2 (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,0183 % H₂O₂) im Verhältnis 1:1 gemischt, die Membran damit benetzt, für 1 min bei RT inkubiert und unmittelbar im Anschluss daran das Lumineszenz-Signal am ECL-Reader ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) detektiert und aufgenommen.

Tabelle 6: Primäre Antikörper, verwendet für die Detektion von IE Proteinen.

Antikörper	Blutung Tage/Tier	Verdünnung	Verdünnungspuffer	Entwicklung
α -AtPIC1	210 / -	1:1700	TTBS	ECL
α -PsNiCo	150 / 2	1:5000	Magermilchpuffer	Alkalische Phosphatase
α -PsYGGT	210 / 1	1:1000	TTBS	ECL
α -PsTIC110	-	1:1000	TTBS	Alkalische Phosphatase
α -PsTIC20	-	1:500	TTBS	ECL

IV.5 Lichtmikroskopie und Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der *Arabidopsis thaliana* Blattmorphologie wurden Querschnitte von Blättern 7 Tage alter Sämlinge und junger Blätter 21 Tage alter Pflanzen angefertigt und unter einem Axiophot Mikroskop von Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena) fotografiert. Die Untersuchung der Ultrastruktur von Chloroplasten aus *Arabidopsis* in Blättern 7 Tage alter Sämlinge und junger Blätter 21 Tage alter Pflanzen, erfolgte mit einem EM 912 Transmissions-Elektronenmikroskop von Carl Zeiss Microscopy GmbH. Die Präparate wurden von Silvia Dobler (AG Prof. Dr. Klingl) und die Aufnahmen von Prof. Dr. Andreas Klingl (Department Biologie I, Pflanzliche Entwicklungsbiologie, Elektronenmikroskopie, Ludwig-Maximilians-Universität München) angefertigt.

Die drei Gene At4g31940, At3g12900 sowie At4g19690 sind direkt mit *HII* co-reguliert (Abb. 7). Das Gen At4g31940 codiert das Protein CYP82C, eine Cytochrom P450 Monooxygenase, welche stark mit Genen korreliert ist, die an der Eisenaufnahme bzw. dem Eisentransport beteiligt sind. Dabei spielt CYP82C womöglich eine Rolle in der frühen Reaktion auf Eisenmangel (Murgia et al., 2011). At3g12900 codiert ein Protein der 2OG-Fe(II)-Oxygenase-Familie, deren Mitglieder die Oxidation von 2-Oxoglutarat und die Fe(II)-abhängige Oxidation organischer Substrate katalysieren (García et al., 2010). At4g19690 codiert den hoch affinen Eisen-Transporter IRT1 (Iron Regulated Transporter 1), der Eisen als zweiwertiges Ion über die Wurzel aufnimmt (Eide et al., 1996; Puig et al., 2007). Da für *HII* keine Transmembranhelices vorhergesagt werden, handelt es sich vermutlich um ein lösliches Protein mit vorhergesagter, chloroplastidärer Lokalisation (ARAMEMNON, Schwacke et al., 2003). Das prä-mature *HII* Protein besteht aus 109 Aminosäuren und besitzt damit ein Molekulargewicht von 11,85 kDa. Das chloroplastidäre Transitpeptid hat laut Vorhersagen 38 Aminosäuren (ChloroP, Emanuelsson et al., 1999), was darauf schließen lässt, dass das mature Protein aus 71 Aminosäuren bestehen sollte und dabei eine Größe von 7,95 kDa aufweist (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>).

V.1.1 Subzelluläre Lokalisation von *HII*

Aufgrund der vorhergesagten Lokalisation von *HII* im Chloroplasten (ARAMEMNON, Schwacke et al., 2003), wurde dessen subzelluläre Lokalisation experimentell untersucht. Hierfür wurden Blätter von Tabak (*Nicotiana benthamiana*) mittels Agrobakterien transient transformiert. Die Agrobakterien trugen dabei entweder Plasmide mit dem C-terminalen *HII-GFP*-Fusionskonstrukt, das zum Nachweis der Lokalisation von *HII* diene oder Plasmide mit dem C-terminalen *OEP7.2-GFP*-Fusionskonstrukt, das als Kontrolle diene. Drei Tage nach der Transformation der Tabakblätter mit den jeweiligen Plasmiden, wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert und die GFP-Fluoreszenzsignale unter einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS SP5, Leica, Wetzlar) detektiert. Da die subzelluläre Lokalisation von OEP7.2 (outer envelope membrane protein 7.2) in der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten bereits bekannt ist (Li und Philippar, unveröffentlicht), diene OEP7.2-GFP als Kontrolle.

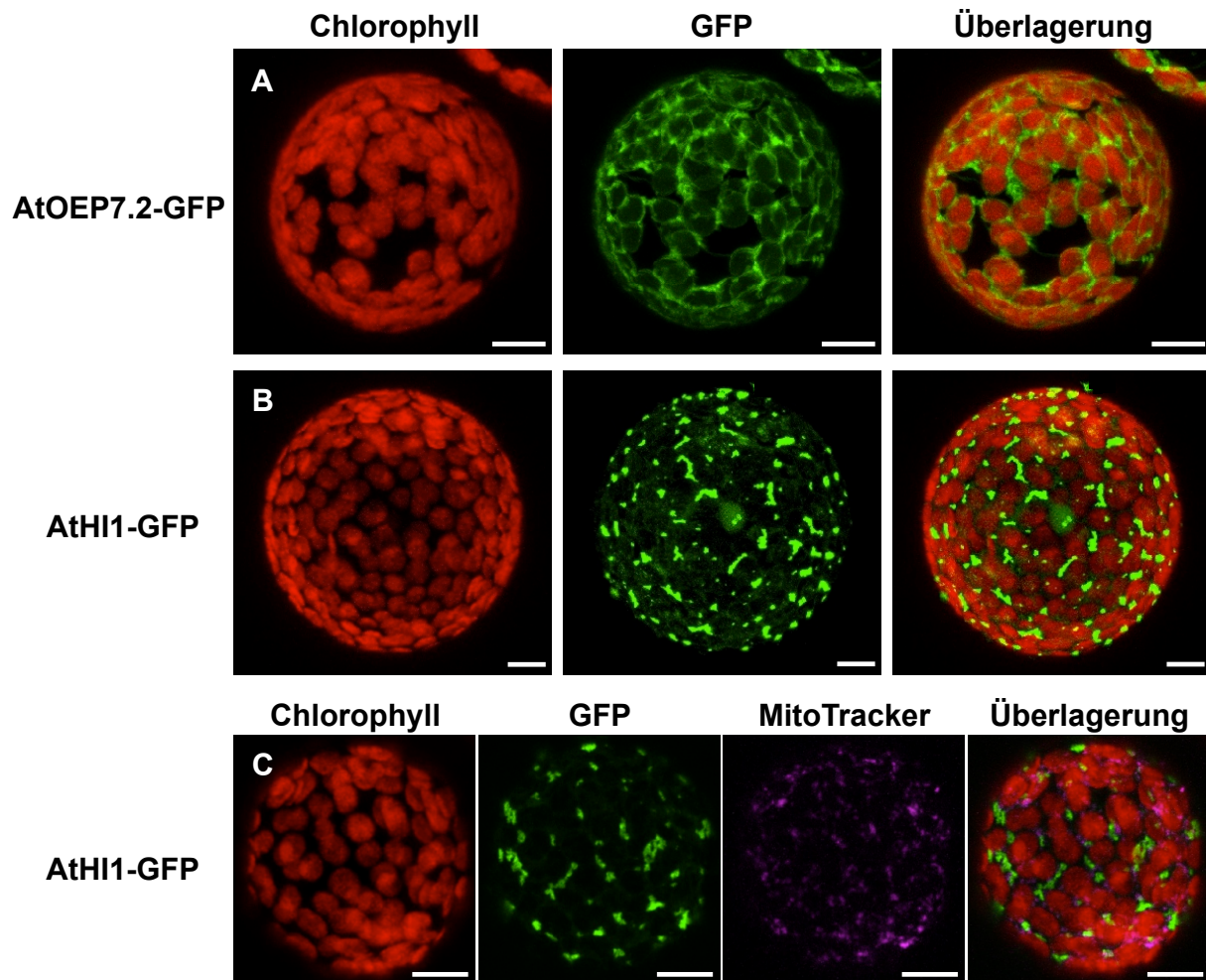


Abbildung 8: Subzelluläre Lokalisation von AtOEP7.2 und AtHI1 in Tabakprotoplasten.

Die C-terminalen GFP-Fusionskonstrukte der Kontrolle *AtOEP7.2-GFP* (**A**) und *AtHI1-GFP* (**B**; **C**) wurden transient in Tabak (*Nicotiana benthamiana*) exprimiert. Abgebildet sind die Chlorophyll-Autofluoreszenz (Chlorophyll), das GFP-Signal (GFP) und die Überlagerung beider Signale (**A**; **B**), sowie zusätzlich das Fluoreszenzsignal der in Mitochondrien lokalisierten Kontrolle MitoTracker und die Überlagerung aller Signale (**C**). Anregungswellenlänge GFP: 488 nm, Emissionswellenlänge: 509 nm; Mikroskop: Leika TCS SP5. Der Maßstab entspricht 10 μm .

Das GFP-Signal des *AtOEP7.2-GFP*-Fusionskonstruktes wurde wie erwartet in der Chloroplastenhülle detektiert und deckte sich in der Überlagerung mit dem Signal der Chlorophyll-Autofluoreszenz (Abb. 8A). Das GFP-Signal des *AtHI1-GFP*-Fusionskonstruktes hingegen zeigte vorwiegend punktförmige Akkumulationen im Protoplasten, die sich nicht eindeutig den Chloroplasten zuordnen ließen. Dies wurde bei der Überlagerung des GFP-Signals mit der Chlorophyll-Autofluoreszenz besonders deutlich (Abb. 8B). Da das GFP-Signal des *AtHI1-GFP*-Fusionskonstruktes weder den Chloroplasten, noch anderen Zellkompartimenten eindeutig zugeordnet werden konnte, wurde eine mögliche Lokalisation in den Mitochondrien untersucht. Zur Überprüfung einer mitochondriellen Lokalisation von *AtHI1-GFP*, wurden extrahierte Protoplasten die bereits das

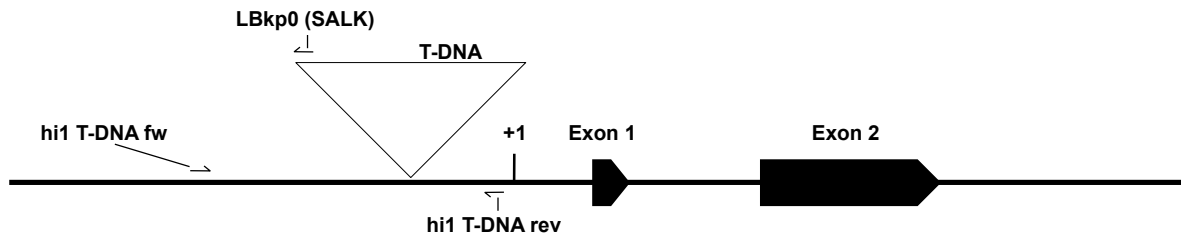
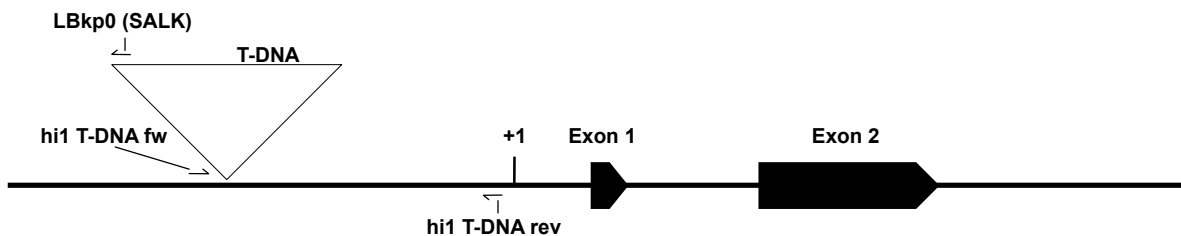
AtHI1-GFP-Fusionskonstrukt enthielten, zusätzlich mit dem Reagenz MitoTracker, welches in Mitochondrien akkumuliert und daher ein mitochondrienspezifisches Fluoreszenzsignal emittiert, behandelt. Da sich das MitoTracker-Signal jedoch ebenfalls nicht mit dem GFP-Signal des AtHI1-GFP-Fusionskonstruktes deckte (Abb. 8C), erscheint eine Lokalisation in den Mitochondrien als unwahrscheinlich.

V.1.2 Charakterisierung von *HII*-Mutanten in *Arabidopsis thaliana*

Kommt es zu einem Verlust essentieller Proteine der pflanzlichen Eisenhomöostase, kann dies zu weitreichenden Problemen in der Pflanzenentwicklung führen. Dies zeigte sich im Falle der Eisenpermease PIC1 (Duy et al., 2007) oder des Eisentransporters IRT1 (Varotto et al., 2002), welcher in der Eisenaufnahme über die Wurzel eine tragende Rolle spielt (Eide et al., 1996). So führt bereits der Verlust eines dieser Proteine, jeweils zu starken Chlorosen und eingeschränktem Wachstum der Pflanze. Um die Funktion des Proteins HI1 in allen Entwicklungsstadien von *Arabidopsis* und im speziellen seine Rolle in der Eisenhomöostase genauer zu untersuchen, wurden sowohl *HII*-T-DNA-Insertionslinien analysiert, als auch *HII*-RNAi-Linien erzeugt.

V.1.2.1 Charakterisierung der *HII*-T-DNA-Insertionslinien

Da es für das Gen *HII* keine *Arabidopsis*-Linien mit einer T-DNA-Insertion in einem der beiden Exons gab, wurden die beiden unabhängigen T-DNA-Insertionslinien *hi1#1* (SALK_035430) und *hi1#2* (SALK_035424) ausgewählt. Beide Linien haben die T-DNA-Insertion nahe am Transkriptionsstart (+1; Neural Network Promoter Prediction Tool, Reese, [2000/2001]) des *HII* Gens (Abb. 9).

hi1#1 (SALK_035430)**hi1#2 (SALK_035424)****Abbildung 9: Schematische Darstellung der *HI1*-T-DNA-Insertionen.**

Das Gen *HI1* beinhaltet 2 Exons (schwarze Pfeilbalken) mit dem Transkriptionsstart (+1) 115 bp vor Exon 1. Die T-DNA-Insertion (Dreieck) befindet sich bei Linie *hi1#1* 268 bp vor Exon 1 und bei Linie *hi1#2* 539 bp vor Exon 1. Die Wildtyp-spezifischen Primer *hi1 T-DNA fw/rev* flankieren die T-DNA-Insertionen. Der T-DNA-spezifische Primer *LBkp0* bindet an das 5'-Ende der T-DNA.

Zur Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien *hi1#1* und *hi1#2* wurden Oligonukleotid-Primer (*hi1 T-DNA fw* und *hi1 T-DNA rev*) entworfen, welche die T-DNA-Insertionen flankieren. Zehn Pflanzen der Linie *hi1#1* und sieben Pflanzen der Linie *hi1#2* wurden mit den *hi1 T-DNA* Primern mittels PCR genotypisiert, wobei vier Pflanzen der Linie *hi1#1* Wildtyp, zwei Pflanzen heterozygot und vier Pflanzen homozygot im Bezug auf die T-DNA-Insertion waren. Von der Linie *hi1#2* entsprach der Genotyp aller sieben Pflanzen an der entsprechenden DNA-Sequenz, dem Wildtyp und enthielt dort keine T-DNA-Insertion. Die Pflanzen der Linie *hi1#1* wurden für die Samenproduktion in Erde pikiert und deren Samen für spätere Analysen und die weitere Vermehrung gesammelt. Von der Aussaat bis zur Samenreife konnte unter Standardbedingungen bei den homozygoten Pflanzen der Linie *hi1#1* kein, vom Wildtyp abweichender Phänotyp festgestellt werden.

V.1.2.2 Erzeugung von *HII*-Antisense- und *HII*-RNAi-Linien

Parallel zum Test der T-DNA-Insertionslinien *hil#1* und *hil#2*, wurden *HII*-Antisense- und *HII*-RNAi-Linien über Agrobakterien vermittelte, stabile Transformation erzeugt. Hierfür wurden der Antisense-Vektor pB2WG7 mit einem Glufosinat-Resistenzmarker und die RNAi-Vektoren pB7GWIWG2 (I), ebenfalls mit einem Glufosinat-Resistenzmarker und pH7GWIWG2 (I) mit einem Hygromycin-Resistenzmarker, gewählt. Sowohl das Antisense- als auch die RNAi-Konstrukte sind nicht induzierbar und werden durch den 35S-Promotor konstitutiv exprimiert.

Insgesamt wurden 20 T1-Pflanzen die den Antisense-Vektor pB2WG7 enthielten, 19 T1-Pflanzen die den RNAi Vektor pB7GWIWG2 (I) enthielten und 20 T1-Pflanzen die den RNAi Vektor pH7GWIWG2 (I) enthielten, auf Selektions-Agar-Medium selektiert und mittels PCR positiv auf Anwesenheit des jeweiligen Vektors getestet. Zur Samenproduktion wurden die Pflanzen auf Erde überführt und die T2-Generation geerntet.

Da das Fluoreszenzsignal des HII-GFP-Fusionskonstruktes in Protoplasten aus Tabakblättern keine genaue subzelluläre Lokalisation zuließ und die T-DNA-Insertionslinie *hil#1* keinen vom Wildtyp verschiedenen Phänotyp aufwies, wurde der Fokus in dieser Arbeit auf die Proteine PIC1, NiCo und YGGT gelegt. Sobald eine subzelluläre Lokalisation von HII möglich erscheint, werden die Analysen wieder aufgenommen, wobei auch die Phänotypisierung der *HII*-RNAi-Linien an nächster Stelle steht.

V.2 Die Eisenpermease PIC1 und deren potentielle Interaktionspartner

Das Protein PIC1 aus *Arabidopsis* wurde als Eisenpermease der inneren Hüllmenbran (IE = inner envelope) von Chloroplasten beschrieben (Duy et al., 2007/2011) und bei der Suche nach potentiellen Interaktionspartnern, die Proteine NiCo1 und NiCo2 aus *Arabidopsis* identifiziert (Dissertation Roland Stübe, 2013). In anschließenden, ersten Interaktionsstudien wurde zusätzlich das Protein YGGT aus Erbse gefunden, wovon es drei ähnliche Proteine, YGGT-A, YGGT-B und YGGT-C, in *Arabidopsis* gibt (Tab. 7).

Tabelle 7: PIC1 und dessen potentielle Interaktionspartner.

Auflistung der PIC1, NiCo und YGGT Proteine aus Erbse und *Arabidopsis*. Aufgeführt sind der jeweils zugehörige AGI-Code, die Länge in Aminosäuren (AS) und die Größe in Kilodalton (kDa) sowohl der Präproteine, als auch der maturen Proteine, die Länge des chloroplastidären Transitpeptids (cTP) in AS, die Anzahl der nachgewiesenen, bzw. vorhergesagten Transmembrandomänen (TMD), die nachgewiesene, bzw. vorhergesagte subzelluläre Lokalisierung und die Ähnlichkeit der Proteine aus *Arabidopsis* zu den entsprechenden Proteinen aus Erbse in %.

Protein	AGI-Code	Präprotein		matur		cTP AS	TMD	Lokalisierung	Ähnlichkeit zu Ps-Protein (%) ³
		AS	kDa ⁹	AS	kDa ⁹				
PsPIC1	-	283 ⁶	30,22	206	21,86	77 ²	4 ²	IE ⁵	
AtPIC1	At2g15290	296 ⁷	31,28	206	21,79	90 ²	4 ⁴	IE ⁴	76
PsNiCo	-	375 ⁶	39,48	314	33,04	62 ¹	6 ⁸	IE ⁸	
AtNiCo1	At4g35080	365 ⁷	38,53	286	30,00	79 ¹	6 ⁸	IE ⁸	69
AtNiCo2	At2g16800	372 ⁷	39,69	294	30,99	78 ¹	6 ⁸	IE ⁸	71
PsYGGT	-	211 ⁶	22,83	142	15,34	69 ¹	3 ⁸	IE ⁸	
AtYGGT-A	At5g21920	251 ⁷	27,27	200	21,85	51 ¹	2 ⁷	Chloroplast ⁷	34
AtYGGT-B	At4g27990	218 ⁷	23,71	135	14,78	83 ¹	3 ⁷	IE ⁸	69
AtYGGT-C	At3g07430	232 ⁷	24,93	156	16,74	76 ¹	3 ⁷	IE ⁸	62

¹: ChloroP, Emanuelsson et al. (1999); ²: Teng et al. (2006); ³: ClustalX, Larkin et al. (2007);
⁴: Duy et al. (2007); ⁵: Dissertation Daniela Duy (2009); ⁶: Franssen et al. (2011);
⁷: ARAMEMNON, Schwacke et al., (2013); ⁸: Dissertation Roland Stübe, (2013);
⁹: <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>

Während PIC1 vier α -helikale Transmembrandomänen besitzt, haben die beiden NiCo Proteine jeweils sechs Transmembrandomänen. Für YGGT-A werden zwei Transmembrandomänen und für YGGT-B und YGGT-C jeweils drei Transmembrandomänen vorhergesagt (ARAMEMNON, Schwacke et al. 2003). Die Proteine PIC1, NiCo1, NiCo2, YGGT-B und YGGT-C wurden mittels *in vivo* GFP-Targeting und Immunoblotanalysen im IE der Chloroplasten lokalisiert (Duy et al., 2007; Dissertation Roland Stübe, 2013). Für das Protein YGGT-A wurde eine Lokalisierung im Chloroplasten vorhergesagt (ARAMEMNON, Schwacke et al. 2003). Das *in vivo* GFP-Targeting von NiCo1 gelang bisher nur in *Arabidopsis*-Protoplasten und nicht im robusteren Tabak-System, weshalb dieses Experiment in modifizierter Form wiederholt wurde.

V.2.1 Subzelluläre Lokalisation der NiCo-Proteine mit Hilfe des p19-Helferplasmids

Die Proteine NiCo1 und NiCo2 wurden bereits in der inneren Chloroplastenhüllmembran lokalisiert (Dissertation R. Stübe, 2013). Die transiente Expression in Tabak (*Nicotiana benthamiana*) war jedoch nur mit dem *AtNiCo2-GFP*-Fusionskonstrukt erfolgreich. Für die subzelluläre Lokalisation von *AtNiCo1*, mussten isolierte Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis* transient mit dem *AtNiCo1-GFP*-Fusionskonstrukt transformiert werden. Um auch ein *AtNiCo1-GFP*-Fusionskonstrukt erfolgreich in Tabak zu exprimieren und weiterführende Analysen im System Tabak wie z.B. BiFC (bimolecular fluorescence complementation) zufriedenstellend realisieren zu können, wurde das Experiment wiederholt. Diesmal wurde allerdings zusätzlich auf die Hilfe des p19-Helferplasmids zurückgegriffen. Das p19-Protein ist ein viral codierter Suppressor des pflanzlichen Gen-"Silencing" des "Tomato-bushy-stunt" Virus und ermöglicht somit erhöhte und stabile transiente Expressionslevel (Voinnet et al., 2003). Aufgrund von posttranskriptionellem Gen-"Silencing" kommt es normalerweise zu einer stark reduzierten Expression des "Gen"-*GFP*-Fusionskonstruktes nach zwei bis drei Tagen. Dieser Effekt kann jedoch unterbunden werden, wenn eine Co-Transformation mit einem, das p19-Protein codierenden Plasmid (p19-Helferplasmid), erfolgt (Voinnet et al., 2003). Für einen Test wurde daher Tabak mit dem *AtNiCo1-GFP*-Fusionskonstrukt zusammen mit dem p19-Helferplasmid, transformiert. Zur Kontrolle erfolgte eine weitere Co-Transformation mit dem *AtNiCo2-GFP*-Fusionskonstrukt. Nach drei Tagen wurden Protoplasten aus den transformierten Tabakblättern isoliert und die GFP-Signale am Laser Scanning Mikroskop untersucht (Abb. 10).

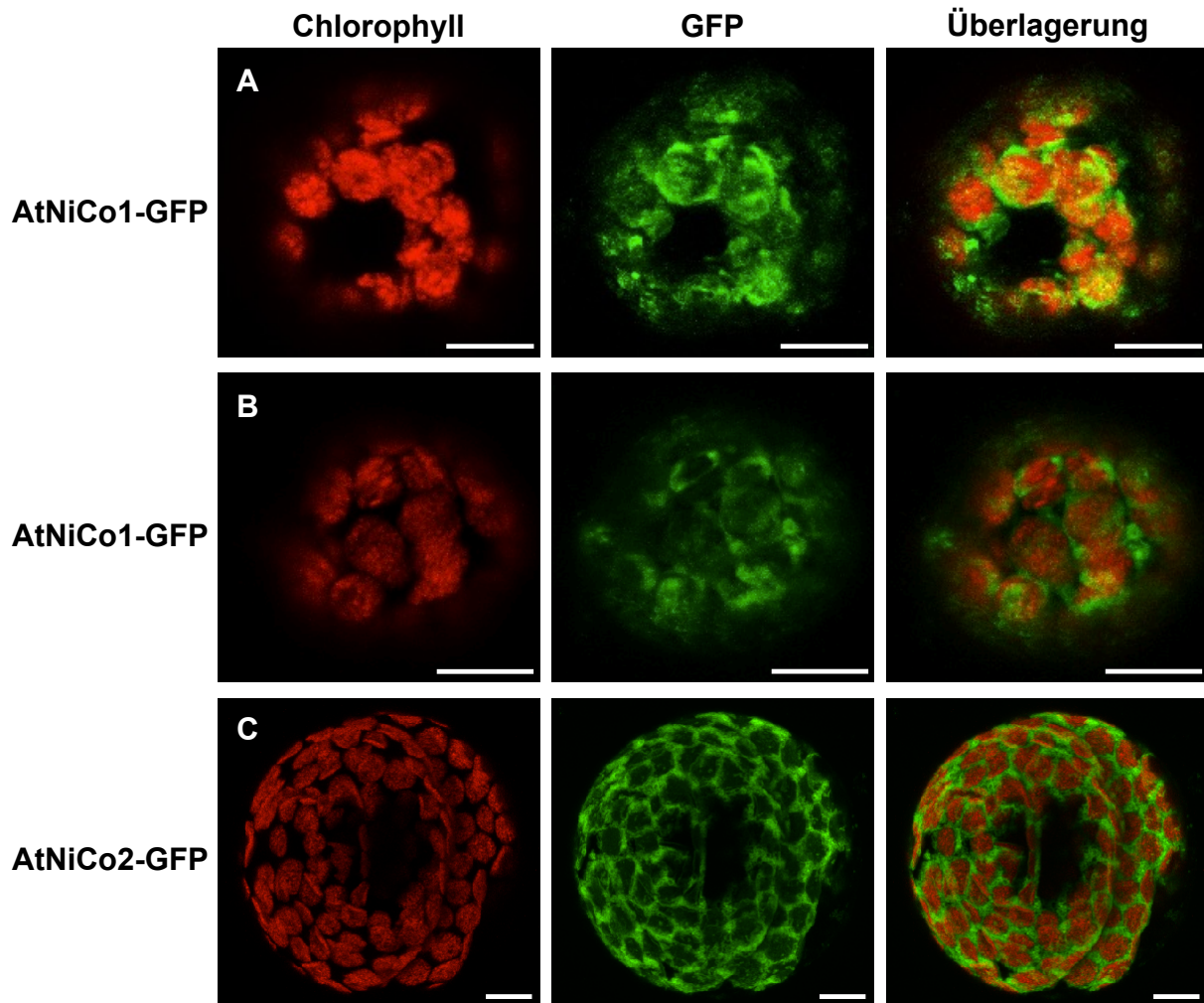


Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation von AtNiCo1 und AtNiCo2 in Tabakprotoplasten.

Durch Agrobakterien wurden die C-terminalen GFP-Fusionskonstrukte *AtNiCo1-GFP* (A; B) und *AtNiCo2-GFP* (C) zusammen mit dem p19-Helferplasmid transient in Tabak (*Nicotiana benthamiana*) exprimiert. Abgebildet sind die Chlorophyll-Autofluoreszenz (Chlorophyll), das GFP-Signal (GFP) sowie die Überlagerung beider Signale. Anregungswellenlänge GFP: 488 nm, Emissionswellenlänge: 509 nm; Mikroskop: Leika TCS SP5. Der Maßstab entspricht 10 µm.

In Protoplasten aus Tabakblättern welche mit dem *AtNiCo1-GFP*-Fusionskonstrukt transformiert wurden, wurde nun ein GFP-Fluoreszenzsignal im Bereich der Chloroplastenhülle detektiert das sich mit der Chlorophyll-Autofluoreszenz deckte (Abb. 10A und B). Auch in den, mit dem *AtNiCo2-GFP*-Fusionskonstrukt transformierten Protoplasten, wurde ein GFP-Fluoreszenzsignal detektiert, das sich im Bereich der Chloroplastenhülle befand und ebenfalls mit der Chlorophyll-Autofluoreszenz deckte (Abb. 10C). Selbst fünf Tage nach der Transformation der Tabakblätter konnte ein starkes GFP-Fluoreszenzsignal detektiert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Das p19-Helferplasmid ermöglichte somit nicht nur die erfolgreiche transiente Expression des *AtNiCo1-GFP*-Konstruktes in Tabak, sondern konnte auch einer nachlassenden Effizienz dessen Expression, drei Tage nach der Transformation, entgegenwirken.

V.2.2 YGGT als potentieller dritter Interaktionspartner im PIC1-NiCo-YGGT-Komplex

Das Protein YGGT wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Roland Stübe als potentieller dritter Interaktionspartner in einem PIC1-NiCo-YGGT-Komplex entdeckt. In voneinander unabhängigen Immunfällungen mit spezifisch gegen AtPIC1 bzw. gegen PsNiCo gerichteten Antikörpern, wurde dabei das Protein YGGT aus Erbse identifiziert, welches das einzige YGGT-Protein in Erbse ist (Franssen et al., 2011). In *Arabidopsis* existieren drei YGGT-Proteine, YGGT-A, YGGT-B und YGGT-C (Lezhneva et al., 2008), für die sowohl eine Lokalisation im Chloroplasten, als auch zwei beziehungsweise drei Transmembrandomänen vorhergesagt wurden (Tab. 7). Ein Aminosäurevergleich der drei maturen *Arabidopsis* YGGT-Proteine mit dem maturen Erbsen YGGT ergab, dass YGGT-B mit 69 % und YGGT-C mit 62 % dem YGGT aus Erbse am ähnlichsten sind, während YGGT-A mit 34 % am wenigsten Ähnlichkeit aufweist (Tab. 7).

Wegen der Proteinsequenz-Ähnlichkeit, wurde die subzelluläre Lokalisation von YGGT-B und YGGT-C genauer untersucht, wodurch beide Proteine in der inneren Chloroplastenhüllmembran lokalisiert wurden (Dissertation Roland Stübe, 2013).

V.3 Das PIC1-NiCo-YGGT-Metalltranslocon in Chloroplasten

Die bisherigen Ergebnisse zu den Proteinen PIC1, NiCo1, NiCo2 und YGGT-B wie auch YGGT-C stützen die Hypothese eines PIC1-NiCo-YGGT-Proteinkomplexes, welcher ein Metalltranslocon in der inneren Chloroplastenhüllmembran darstellt (Abb. 11).

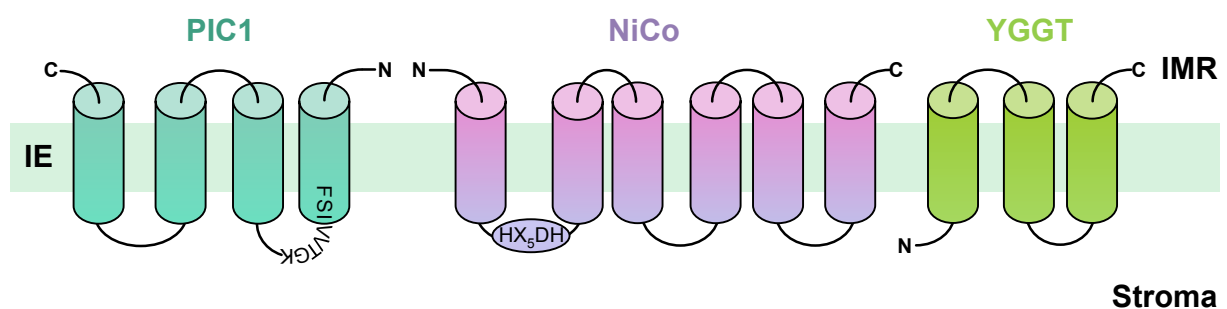


Abbildung 11: Modell des hypothetischen PIC1-NiCo-YGGT Metalltranslocons.

Transmembrane Helices sind als Zylinder dargestellt und durchziehen die innere Hüllmembran (IE) der Chloroplasten vom Intermembranraum (IMR) zum Stroma. PIC1 beinhaltet den TonB-Box-Core (FSIVVTGK) und NiCo die HX₅DH-Domäne zwischen der 1. und der 2. Helix. Für YGGT ist die Orientierung und Membran-Topologie nicht experimentell bestätigt. Topologie und Lokalisation nach ARAMEMNON, Schwacke et al., (2013); Dissertation Roland Stübe, (2013).

Das Protein PIC1 könnte dabei die Metall-Permease dieses Komplexes darstellen. NiCo mit seiner HX₅DH-Domäne, für die in bakteriellen NiCoT-Proteinen eine Funktion in der Metallerkennung und -bindung beschrieben wurde (Eitinger et al., 2005), könnte in diesem Translocon die Funktion als metallbindende und/oder sensorische Untereinheit übernehmen. Das Protein YGGT unterstützt dabei möglicherweise die Metallerkennung und -bindung durch NiCo. Die Proteine PIC1, NiCo und YGGT weisen damit Parallelen zu den Untereinheiten bakterieller CbiMNQO/NikMNQO ABC-Transporter auf, welche ebenfalls drei transmembrane Untereinheiten mit vergleichbarer Funktion besitzen (Rodionov et al., 2006). Eine Interaktion zwischen PIC1 und den NiCo-Proteinen sowie den NiCo-Proteinen und YGGT-B als auch YGGT-C, konnte bisher nur im Split-Ubiquitin-System in Hefe nachgewiesen werden (Dissertation Roland Stübe, 2013) und sollte daher mit einem biochemischen Ansatz verifiziert werden.

V.3.1 Überprüfung eines PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes über native Fraktionierung

Eine Möglichkeit die Assemblierung von Proteinen zu einem Proteinkomplex zu untersuchen besteht darin, die nativen Proteinkomplexe zuerst schonend zu isolieren, zu fraktionieren und die einzelnen Untereinheiten anschließend unter denaturierenden Bedingungen durch SDS (sodium dodecyl sulfate), über eine PAGE (Poly-Acrylamid Gel-Elektrophorese) aufzutrennen. Die Detektion der im Anschluss auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragenen Proteine, erfolgt über spezifische Antikörper. Da für den biochemischen Ansatz zum Nachweis eines PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes die Detektion der Proteine in Fraktionen der inneren Hüllmembran von Chloroplasten aus Erbse erfolgte, handelt es sich hierbei um Erbsenproteine.

V.3.1.1 Fraktionierung der IE von Chloroplasten über Dichtegradientenzentrifugation

Während der Dichtegradientenzentrifugation akkumulieren Proteinkomplexe in Abhängigkeit von Faktoren wie Form, Größe, Masse und Dichte, bei einer bestimmten Dichte eines Gradienten, welcher durch Zentrifugation aufrechterhalten wird (Harlow und Lane, 1988). Um zu untersuchen ob die Proteine PIC1, NiCo und YGGT innerhalb eines Komplexes interagieren, wurden innere Hüllmembranen von Chloroplasten aus Erbse mit Dodecyl- β -D-Maltosid solubilisiert und innerhalb eines linearen Saccharosegradienten von 10 - 50 % Saccharose, fraktioniert. Nach der Zentrifugation wurde der Saccharosegradient in 13 Fraktionen unterteilt und die Proteinkomplexe nach Denaturierung über eine SDS-PAGE in ihre Untereinheiten aufgetrennt. Über den anschließend erstellten Western-Blot erfolgte die Immunodetektion der Proteine NiCo, PIC1 und YGGT (Abb. 12).

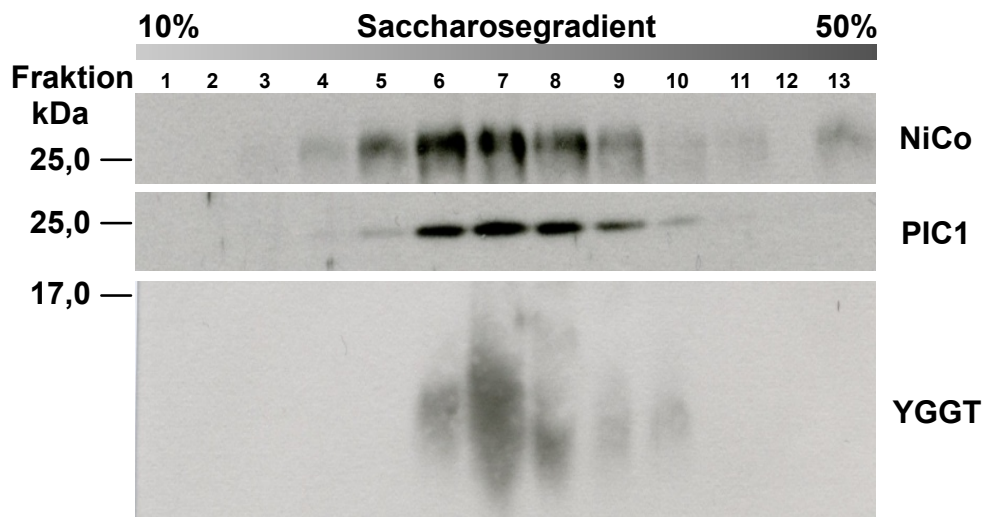


Abbildung 12: Immunodetektion der Proteine NiCo, PIC1 und YGGT in den IE-Fractionen.

Immunodetektion der Proteine NiCo, PIC1 und YGGT mit spezifischen Antikörpern in Fraktionen (1 - 13) der inneren Hüllmembran von Erbsenchloroplasten, solubilisiert mit Dodecyl- β -D-Maltosid und fraktioniert in einem linearen Saccharosegradienten (10 – 50 % w/v). Das Molekulargewicht des Größenstandards ist in Kilodalton (kDa) angegeben (Daten von Roland Stübe, unveröffentlicht).

Das Protein NiCo konnte bei ca. 30 kDa, PIC1 bei ca. 22 kDa und YGGT bei ca. 13 kDa durch die spezifischen Antikörper detektiert werden, was den Größen der maturen Proteine entspricht (vgl. Tab. 7). Die Akkumulationsmaxima aller drei Proteine waren dabei in den Fraktionen 6, 7 und 8, wobei die spezifischen Banden in Fraktionen geringerer oder höherer Dichte sehr viel schwächer ausgeprägt, beziehungsweise abwesend waren.

In einem weiteren Ansatz sollten die in Abbildung 12 gezeigten Ergebnisse bestätigt werden, wobei nun die Immunodetektion der Proteine NiCo, PIC1 und TIC20 erfolgte (Abb. 13). TIC20 wurde untersucht, da es vermeintlich zusammen mit PIC1 in einem 1-MDa Komplex interagiert (Kikuchi et al., 2009; Teng et al., 2006).

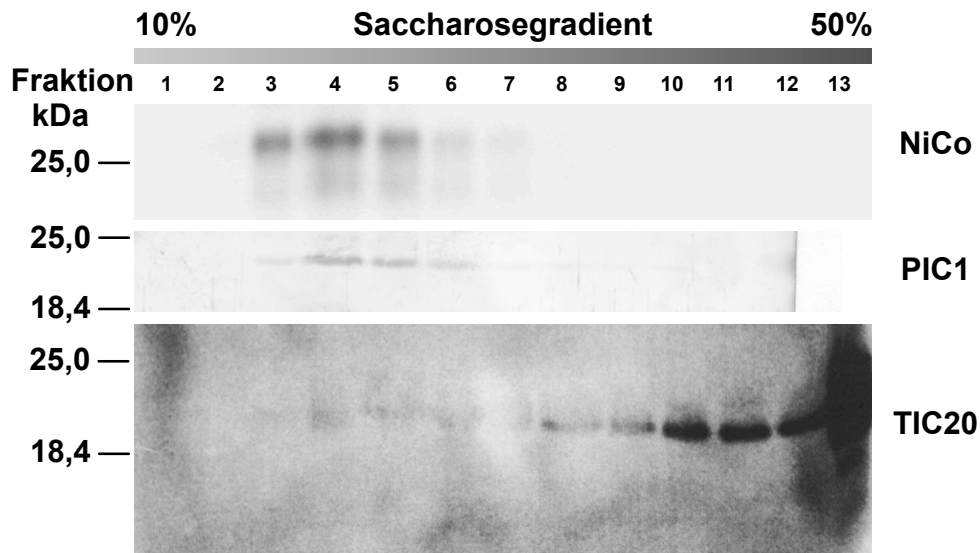


Abbildung 13: Immunodetektion der Proteine NiCo, PIC1 und TIC20 in den IE-Fractionen.

Immunodetektion der Proteine NiCo, PIC1 und TIC20 mit spezifischen Antikörpern in Fraktionen (1 - 13) der inneren Hüllmembran von Erbsenchloroplasten, solubilisiert mit Dodecyl- β -D-Maltosid und fraktioniert in einem linearen Saccharosegradienten (10 – 50 % w/v). Das Molekulargewicht des Größenstandards ist in Kilodalton (kDa) angegeben. Die 13. Fraktion für den PIC1-Immunoblot wurde nicht aufgetragen, da sie verunreinigt war. Das Molekulargewicht des Größenstandards ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

Die Proteine NiCo und PIC1 hatten ihre Akkumulationsmaxima in den Fraktionen 3, 4 und 5 (NiCo) beziehungsweise 3, 4, 5 und 6 (PIC1), wobei sie in den Fraktionen 1 und 2, sowie ab Fraktion 7 und aufwärts kaum, bzw. nicht nachweisbar waren. Das Protein TIC20 wurde bei ca. 20 kDa detektiert und hatte seine Akkumulationsmaxima dagegen in den Fraktionen 10, 11, 12 und 13. In Fraktionen geringerer Dichte war es kaum bis nicht mehr nachzuweisen. Die Detektion der Proteine PIC1 und NiCo in den gleichen IE-Fractionen von Erbsenchloroplasten, wurde somit bestätigt. Die native Fraktionierung der IE von Erbsenchloroplasten lässt daher den Schluss zu, dass die Proteine PIC1, NiCo und YGGT Untereinheiten eines gemeinsamen Komplexes sind. Eine Interaktion von PIC1 mit TIC20 innerhalb eines Komplexes hingegen, kann als unwahrscheinlich angesehen werden.

V.3.1.2 Fraktionierung der IE von Chloroplasten über eine "Blue-Native"-PAGE

Während einer "Blue-Native"-PAGE (1. Dimension) werden schonend solubilisierte Proteinkomplexe nativ aufgetrennt. Proteine eines Komplexes werden in einer anschließenden SDS-PAGE (2. Dimension) somit in einer vertikalen Linie unterhalb der Laufhöhe der 1. Dimension, zu welcher der Proteinkomplex wanderte, ihrer Größe nach aufgetrennt (Harlow und Lane, 1988). Für einen weiteren Nachweis, dass die Proteine PIC1, NiCo und YGGT innerhalb eines Komplexes interagieren, wurden IE von Chloroplasten aus Erbse über eine "Blue-Native"-PAGE fraktioniert (1. Dimension). Unter denaturierenden Bedingungen erfolgte die Auftrennung der Untereinheiten der Proteinkomplexe durch eine SDS-PAGE (2. Dimension). Auf dem anschließend erstellten Western-Blot erfolgte die Immunodetektion der Proteine TIC110, NiCo, PIC1, TIC20 und YGGT durch spezifische Antikörper (Abb. 14).

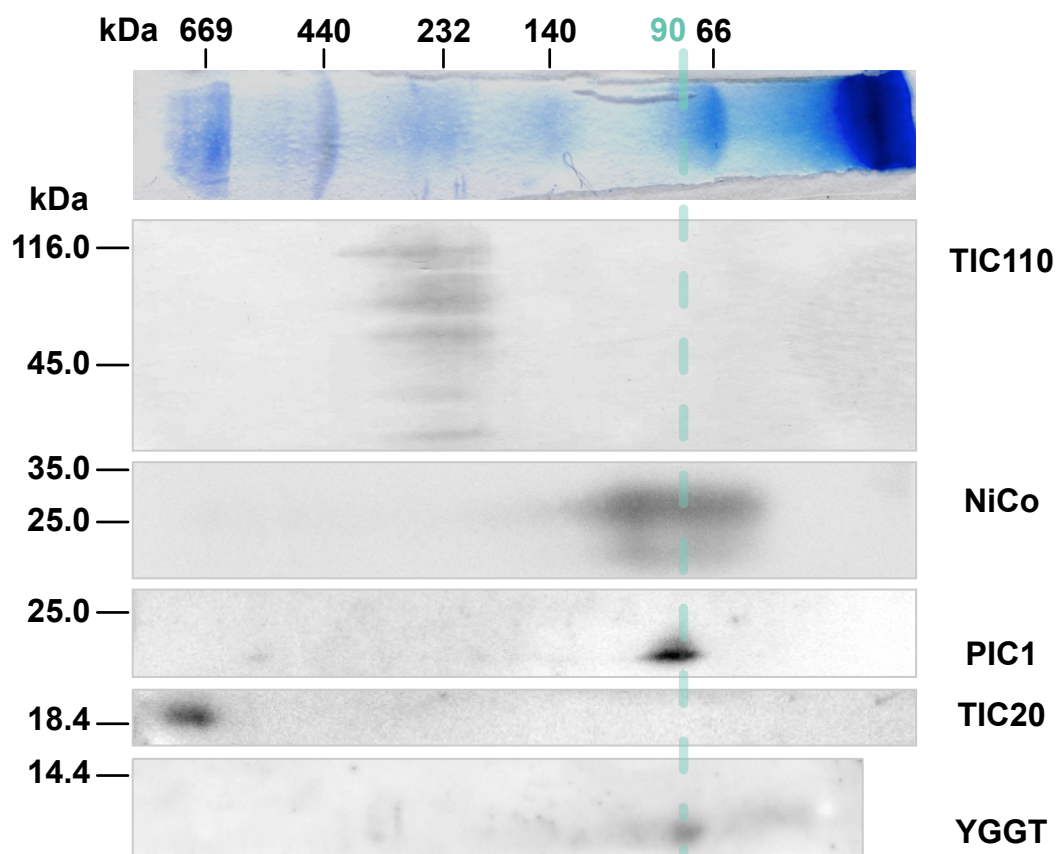


Abbildung 14: Immunodetektion der Proteine TIC110, NiCo, PIC1, TIC20 und YGGT in der 2. Dimension einer "Blue-Native"-PAGE/SDS-PAGE.

Immunodetektion der Proteine TIC110, NiCo, PIC1, TIC20 und YGGT der inneren Hüllmembran von Erbsenchloroplasten mit spezifischen Antikörpern in der 2. Dimension einer "Blue-Native"-PAGE. Das Molekulargewicht des Größenstandards ist in Kilodalton (kDa) angegeben. Die Laufmittelfront der 1. Dimension wurde für die SDS-PAGE des YGGT-Immunoblots entfernt, weshalb der Blotstreifen kürzer ist. Das Molekulargewicht der Größenstandards ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

TIC110 diente als Kontrolle, da es nicht mit PIC1 in einem Komplex interagiert (Kovács Bogdán et al., 2011) und konnte auf einer Höhe von ca. 110 kDa detektiert werden. Allerdings gab es noch weitere Banden die bis auf ca. 35 kDa herabreichen und möglicherweise durch Degradierung von TIC110 zustande kommen. NiCo konnte auf einer Höhe von ca. 30 kDa detektiert werden, lieferte dabei aber keine scharf begrenzte Bande. Dieses Verhalten zeigte sich allerdings in mehreren Experimenten, die alle zum gleichen Ergebnis führten. Das Protein PIC1 konnte bei ca. 22 kDa und YGGT bei ca. 13 kDa detektiert werden. TIC20 lieferte ein Signal bei ca. 20 kDa. In der 2. Dimension wurden die Proteine NiCo, PIC1 und YGGT in einer vertikalen Linie bei ca. 90 kDa der 1. Dimension aufgetrennt (Abb. 14). Das Protein TIC110 wurde dagegen im Bereich um 232 kDa des nativen Komplexes und TIC20 in einem Bereich über 669 kDa des nativen Komplexes detektiert. Somit ist PIC1 keine Untereinheit eines TIC20-Komplexes. Die Co-Migration der Proteine PIC1, NiCo und YGGT in der 2. Dimension der "Blue-Native"-PAGE bestätigt jedoch die Existenz eines PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes.

V.3.2 Die TonB-Box-Domäne in PIC1 als möglicher Interaktionsvermittler

Am N-Terminus des Proteins PIC1 wurde eine TonB-Box-Domäne annotiert (Abb. 15), die die Aminosäuren 1 – 58 des maturen Proteins umfasst (The PROSITE database, Sigrist et al. 2013; Dissertation Roland Stübe 2013). In bakteriellen Transportsystemen wie FecA, dem Eisen-Citrat-Transporter der äußeren Membran von *E. coli*, vermittelt die TonB-Box-Domäne die Interaktion mit dem TonB-Protein und ist somit an der Regulation des Eisen-Citrat-Transportes beteiligt (Ogierman und Braun, 2003). Charakteristisch für die TonB-Box-Domäne von Proteinen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, ist der TonB-Box-Core mit einer konservierten Aminosäureabfolge (Buchanan et al., 1999). Auch die TonB-Box-Domäne in PIC1 besitzt einen konservierten TonB-Box-Core mit den Aminosäuren Phenylalanin-Serin-Isoleucin-Valin-Valin-Threonin-Glycin-Lysin an den Positionen 51 – 58 (Abb. 15).

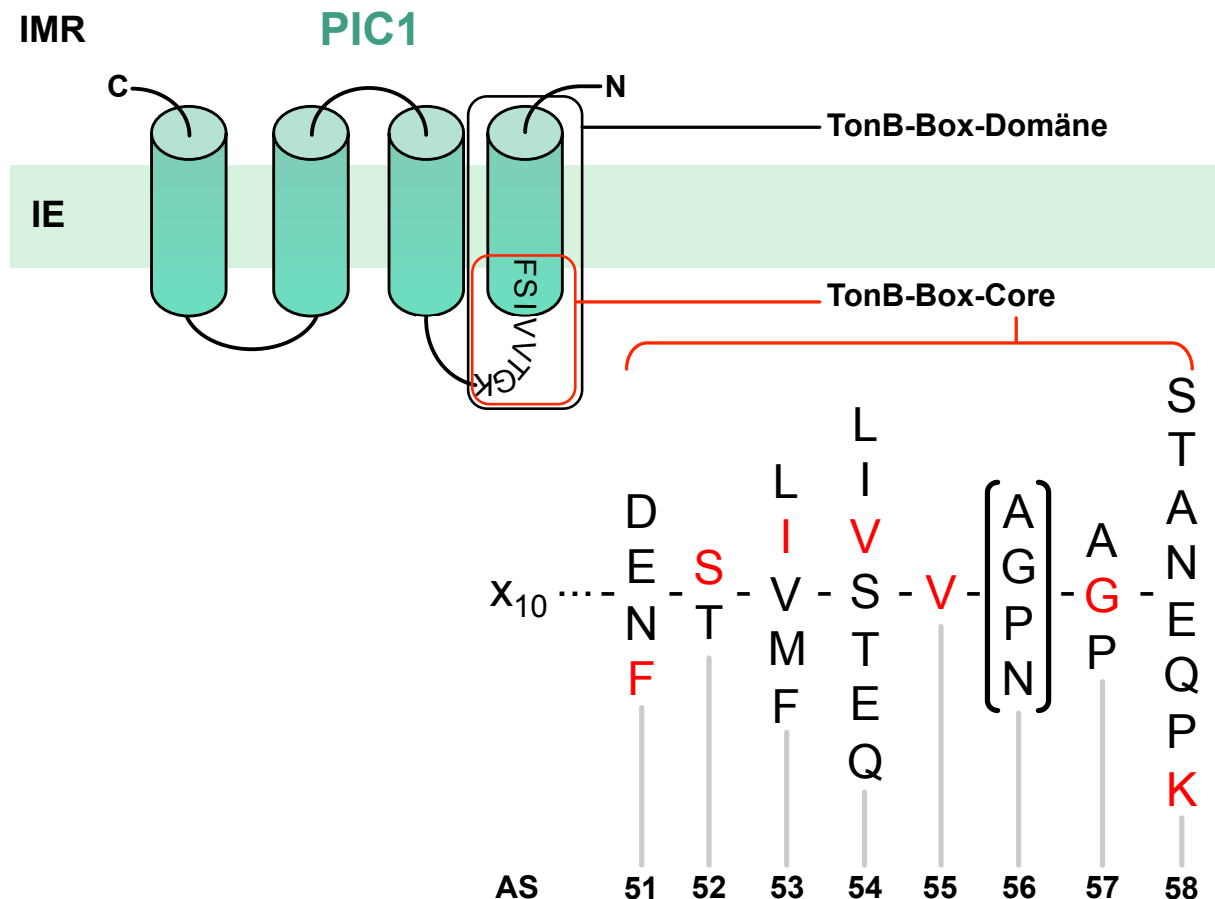


Abbildung 15: Die TonB-Box-Domäne in PIC1.

Schematische Darstellung der TonB-Box-Domäne in PIC1. Die TonB-Box-Domäne (schwarzes Rechteck) erstreckt sich am N-Terminus über die erste Transmembrandomäne hinaus. Der TonB-Box-Core (rotes Rechteck) ist stark konserviert (rote Klammer) und enthält in PIC1 die Aminosäuren in rot. Aminosäuren die im TonB-Box-Core an einer speziellen Stelle nicht vorkommen, sind in schwarze, gebogene Klammern gefasst. 51-58: Position der Aminosäuren (AS) im PIC1 Protein.

V.3.2.1 Hefe-Split-Ubiquitin-Tests zum Nachweis einer PIC1-NiCo-YGGT-Interaktion

Die TonB-Box-Domäne des Proteins PIC1 scheint sowohl für die PIC1-PIC1-Interaktion als auch für die Interaktion von PIC1 mit den beiden Proteinen NiCo1 und NiCo2, eine tragende Rolle zu spielen. Während in einem Split-Ubiquitin-Test in Hefe das Protein PIC1 mit PIC1, sowie PIC1 mit NiCo1 und NiCo2 interagiert, war eine Interaktion nicht mehr möglich, sobald die TonB-Box-Domäne in PIC1 deletiert wurde. Auch ein Aminosäureaustausch von einem Valin zu einem Prolin an Position 43 innerhalb der ersten α -Helix von PIC1, führte zu einem Ausbleiben der Protein-Protein-Interaktion (Dissertation Roland Stübe, 2013). Durch die Deletion fehlt die TonB-Box-Domäne von PIC1 komplett und steht für eine Interaktion mit anderen Proteinen nicht mehr zur Verfügung. Die Mutation an Position 43 von einem Valin zu einem Prolin führt dagegen möglicherweise zu einer Strukturveränderung im Protein

PIC1, da Prolin innerhalb einer Helix als Strukturbrecher gilt. Um die Rolle der TonB-Box näher zu untersuchen, rückt das stark konservierte Motiv, der TonB-Box-Core in den Fokus. Dieses Motiv wurde in Proteinen der äußeren Membran von *E. coli* bereits durch Mutation einzelner Aminosäuren auf dessen Funktionsverlust hin untersucht (Abb. 16).

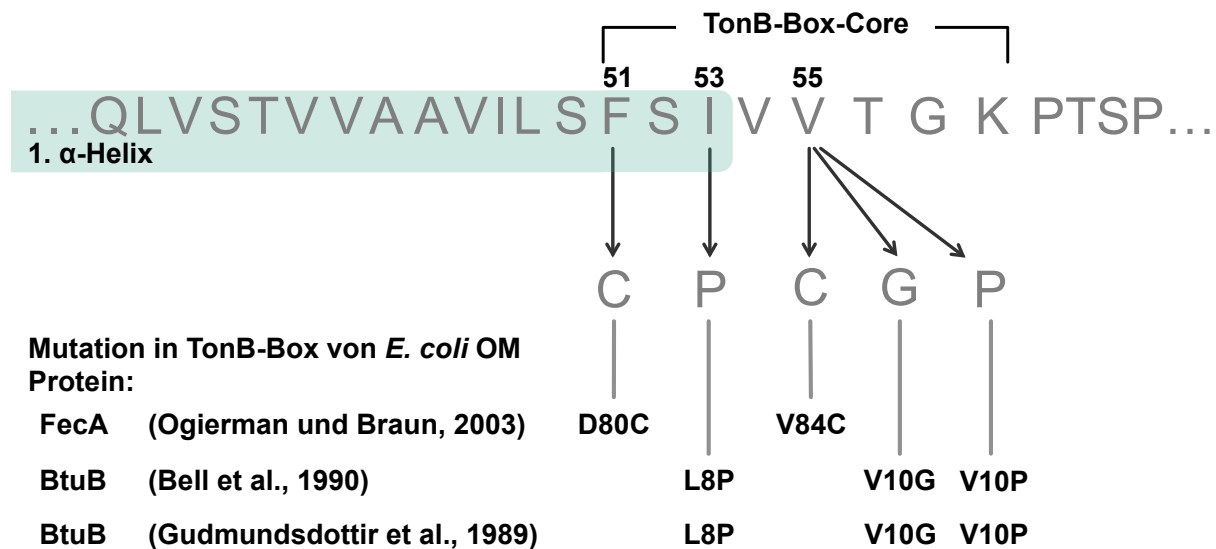


Abbildung 16: Mutationen im TonB-Box-Core.

Die Aminosäuren des konservierten TonB-Box-Cores Phenylalanin an der Position 51 (F₅₁), Isoleucin an der Position 53 (I₅₃) und Valin an der Position 55 (V₅₅) des maturen Proteins AtPIC1, wurden zu den Aminosäuren Cystein (C), Prolin (P) oder Glycin (G) mutiert. Die Aminosäuren F₅₁ und I₅₃ befinden sich dabei noch in der α -Helix, während V₅₅ bereits Bestandteil des Loops zwischen Helix 1 und Helix 2 ist. Die Mutationen in AtPIC1 entsprechen dabei den in der Literatur beschriebenen Mutationen in der TonB-Box der Proteine FecA und BtuB der äußeren Membran (OM = outer membrane) von *E. coli*, angedeutet mit deren jeweiligen Position.

Interaktionsstudien zwischen FecA, einem Eisen-Citrat-Transporter in *E. coli* und dem TonB-Protein zeigten, dass bereits jeweils eine Mutation der Asparaginsäure an Position 80 und des Valins an Position 84 der TonB-Box zu einem Cystein, zu stark reduzierten Transportraten führt (Ogierman und Braun, 2003). Mutationen in der TonB-Box des BtuB Proteins von *E. coli*, welches an der Aufnahme des Vitamin-B₁₂ beteiligt ist, hatten ebenfalls negative Effekte auf die Transportfunktion des Proteins. Wurden das Leucin an Position 8 durch ein Prolin ausgetauscht oder das Valin an Position 10 durch Glycin bzw. Prolin ersetzt, so kam es zum Erliegen des Vitamin-B₁₂ Transportes (Gudmundsdottir et al., 1989; Bell et al., 1990). Übertragen auf den TonB-Box-Core von PIC1, entsprechen diese Mutationen denen in Abbildung 16. Für die Untersuchung der Rolle die TonB-Box in PIC1 für eine Protein-Protein-Interaktion spielt, wurden somit unabhängig voneinander das Phenylalanin an Position 51 zu einem Cystein (F51C), das Isoleucin an Position 53 zu einem Prolin (I53P) und das Valin an Position 55 zu Cystein (V55C), Glycin (V55G) oder Prolin

(V55P) mutiert. Dadurch entstanden fünf separate TonB-Box-Mutanten in PIC1, die mit einem Split-Ubiquitin-Test in Hefe auf Protein-Protein Interaktion hin getestet wurden. Bei den Proteinen in den Split-Ubiquitin-Tests in Hefe handelt es sich dabei stets um mature *Arabidopsis* Proteine.

Für den Split-Ubiquitin-Test wurden Hefezellen des Stammes NMY51 mit PIC1 im Bait-Konstrukt transformiert. Eine zweite Transformation wurde jeweils mit der Negativ- sowie der Positivkontrolle, als auch mit PIC1 und den fünf PIC1 TonB-Box-Mutanten vorgenommen (Abb. 17 und 18). Die Hefen wuchsen dabei sowohl auf Transformations-Kontrollmedium SD -2 (synthetic defined, -Trp, -Leu) als auch auf Selektivmedium SD -4 (synthetic defined, -Trp, -Leu, -His, -Adenin).

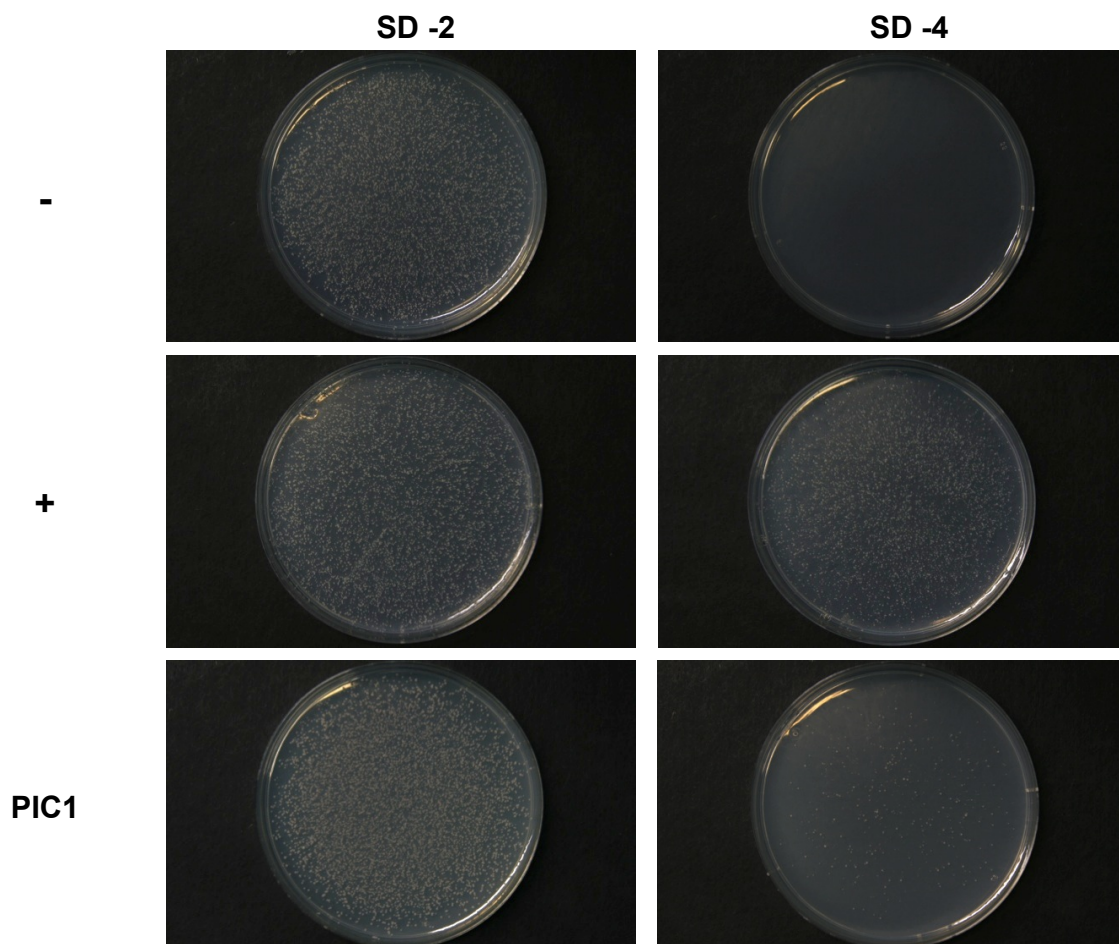


Abbildung 17: Split-Ubiquitin-Test mit PIC1 als Bait- und Prey-Protein.

Hefekolonien des Split-Ubiquitin-Systems mit PIC1 im Bait-Konstrukt und den Kontrollen (+/-) sowie PIC1 im Prey-Konstrukt. Die Hefen wuchsen auf Transformations-Kontrollmedium (SD -2) und Selektivmedium (SD -4) und wurden nach 48 Stunden Inkubation bei 30°C, fotografiert.

Die Ergebnisse des Split-Ubiquitin-Tests sind exemplarisch in den Abbildungen 17 und 18 zu sehen, wobei im Falle der Negativkontrolle kein Hefewachstum auf dem Selektivmedium

(SD -4) beobachtet werden konnte. Bei der Positivkontrolle und bei PIC1 im Prey-Konstrukt jedoch wuchsen Hefekolonien auf Selektivmedium (Abb. 17).

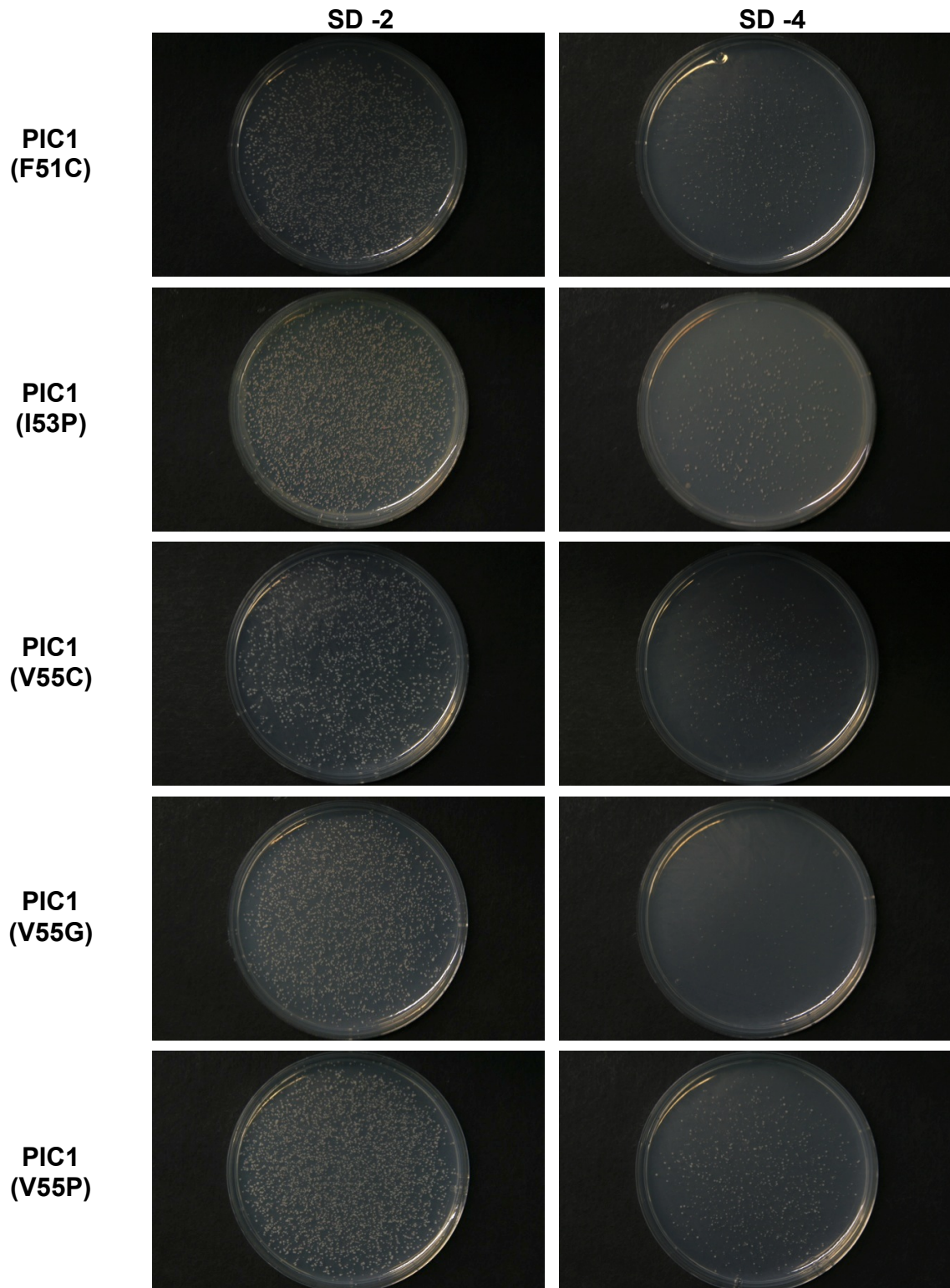


Abbildung 18: Split-Ubiquitin-Test mit PIC1 als Bait- und den mutierten PIC1 als Prey-Protein. Hefekolonien des Split-Ubiquitin-Systems mit PIC1 im Bait-Konstrukt und den PIC1 TonB-Box-Mutanten (F51C, I53P, V55C, V55G, V55P) im Prey-Konstrukt. Die Hefen wuchsen auf Transformations-Kontrollmedium (SD -2) und Selektivmedium (SD -4) und wurden nach 48 Stunden Inkubation bei 30°C, fotografiert.

Bei allen Hefen mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Konstrukt wuchsen Kolonien auf dem Selektivmedium. Die Anzahl der Hefekolonien mit den Mutationen F51C und I53P war vergleichbar mit der Anzahl der Hefekolonien mit nicht mutiertem PIC1, bzw. geringfügig höher. Bei Hefen mit der V55C und der V55P Mutation wuchsen deutlich mehr Kolonien und bei Hefe mit der V55G Mutation dagegen deutlich weniger als bei Hefen mit nicht mutiertem PIC1 (Abb. 17 und 18).

Die Hefekolonien eines jeden Bait-Prey-Paares auf dem Transformations-Kontrollmedium (SD -2) und dem Selektivmedium (SD -4) wurden in drei unabhängigen Ansätzen ausgezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Hefekolonien auf SD -4 an den jeweils entsprechenden Hefekolonien auf SD -2 (SD -4/SD -2) ermittelt (Abb. 19).

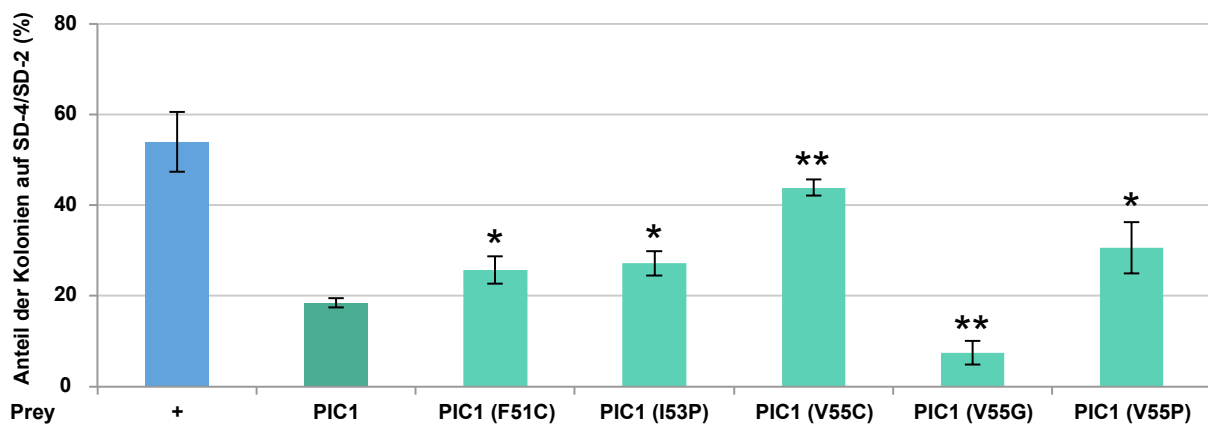


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der Hefekolonien auf Selektivmedium an den Hefekolonien auf Transformations-Kontrollmedium.

Prozentualer Anteil der Hefekolonien auf Selektivmedium (SD -4) an den Hefekolonien auf Transformations-Kontrollmedium (SD -2) jeden Bait/Prey-Paares (Bait: PIC1; Prey: PIC1 und die PIC1 TonB-Box-Mutanten F51C, I53P, V55C, V55G, V55P) und der Positivkontrolle (+); (n=3; \pm SA). Da bei der Negativkontrolle keine Hefekolonien auf dem Selektivmedium wuchsen, wird diese nicht aufgeführt. Der Anteil der Hefekolonien auf Selektivmedium an den Hefekolonien auf Transformations-Kontrollmedium, war für Hefen mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten signifikant verschieden zu den Hefen mit nicht mutiertem PIC1 (P-Wert: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$)

Bei Hefen mit der Negativkontrolle im Prey-Konstrukt wuchsen keine Kolonien auf SD -4. Bei den Hefen mit der Positivkontrolle betrug der Anteil aller auf SD -4 gewachsenen Kolonien an jenen die auf SD -2 wuchsen, 53,9 %. Für PIC1 betrug dieser Anteil 18,5 % und da bereits bekannt war, dass PIC1 mit PIC1 interagiert, wurde dieser Wert als positiv für eine Interaktion gewertet. Die Anteile aller auf SD -4 gewachsenen Kolonien an jenen die auf SD -2 wuchsen, betrugen bei den fünf PIC1 TonB-Box-Mutanten für F51C 25,7 %, für I53P 27,1 %, für V55C 43,9 %, für V55G 7,5 % und für V55P 30,6 %. Die Mutationen F51C und I53P führten somit zu einer leicht verstärkten PIC1-PIC1-Interaktion, wobei der Interaktionsverstärkende Effekt bei der V55P und insbesondere der V55C Mutation am

stärksten ausgeprägt war. So war der Anteil (SD -4/SD -2) der Hefekolonien mit der V55P Mutation um den Faktor 1,7 gegenüber dem Anteil (SD -4/SD -2) der Hefekolonien mit nicht mutierten PIC1 erhöht. Der Anteil (SD -4/SD -2) der Hefekolonien mit der Mutation V55C fiel um den Faktor 2,4 sogar mehr als doppelt so hoch aus, wie der Anteil (SD -4/SD -2) an Hefekolonien mit nicht mutiertem PIC1. Lediglich die Mutation V55G führe zu einer Abschwächung der PIC1-PIC1-Interaktion, wobei der Anteil (SD -4/SD -2) der Hefekolonien mit diesem Konstrukt weniger als halb so hoch ausfiel (Faktor 0,4) wie der Anteil (SD -4/SD -2) der Hefekolonien mit nicht mutiertem PIC1.

Neben der PIC1-PIC1-Interaktion mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Konstrukt wurde auch die Interaktion von NiCo1 und NiCo2 im Bait-Konstrukt mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Konstrukt in mehreren unabhängigen Ansätzen getestet. NiCo1 und NiCo2 schienen allerdings nicht als Bait-Protein geeignet zu sein, da bei den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Konstrukt keine, und selbst bei der Positivkontrolle im Prey-Konstrukt, kaum Hefekolonien wuchsen. Die Interaktion von NiCo1 und NiCo2 mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten wurde daher in einem β -Galactosidase-Assay getestet, wofür NiCo1 und NiCo2 als Prey-Proteine benutzt wurden. Mit dem nicht mutierten PIC1 im Bait-Konstrukt und den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Konstrukt erfolgte der Split-Ubiquitin-Test lediglich einseitig, da die PIC1 TonB-Box-Mutanten nicht als Bait-Proteine getestet wurden. Daher sollte untersucht werden, ob Tests mit den TonB-Box-Mutanten im Bait-Konstrukt und dem nicht mutierten PIC1 im Prey-Konstrukt, zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Außerdem ermöglicht der verwendete Hefe-Split-Ubiquitin-Test die Quantifizierung der Interaktion über eine β -Galactosidase-Aktivität. Kommt es im Hefe-Split-Ubiquitin-System zu einer Interaktion zwischen Bait- und Prey-Protein, erfolgt die Expression des *lacZ*-Gens, welches die β -Galactosidase codiert. Über die Spaltung von X-Gal durch β -Galactosidase und der Intensitätsmessung der daraus resultierenden Blaufärbung, kann die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt werden. Die β -Galactosidase-Aktivität dient somit zur Bestimmung der relativen Stärke einer Protein-Protein-Interaktion und ist genauer als ein manuelles Auszählen der Hefekolonien. Aus diesem Grund erfolgten die weiteren Tests über einen β -Galactosidase-Assay des Split-Ubiquitin-Tests, wofür die drei PIC1 TonB-Box-Mutanten V55C, V55G und V55P aus dem Prey-Konstrukt in das Bait-Konstrukt umkloniert wurden. Für den β -Galactosidase-Assay wurden die Prey-Konstrukte mit PIC1, sowie mit den beiden Proteinen NiCo1 und NiCo2, jeweils in Hefen mit den Bait-Konstrukten PIC1 und den TonB-Box-Mutanten V55C, V55G und V55P, getestet. Die β -Galactosidase-Aktivität wurde

photometrisch bestimmt und mit einem Leerwert abgeglichen. Die Negativkontrolle wurde gleich 0 gesetzt und die jeweilige Positivkontrolle gleich 100 % (Abb. 20 und 21).

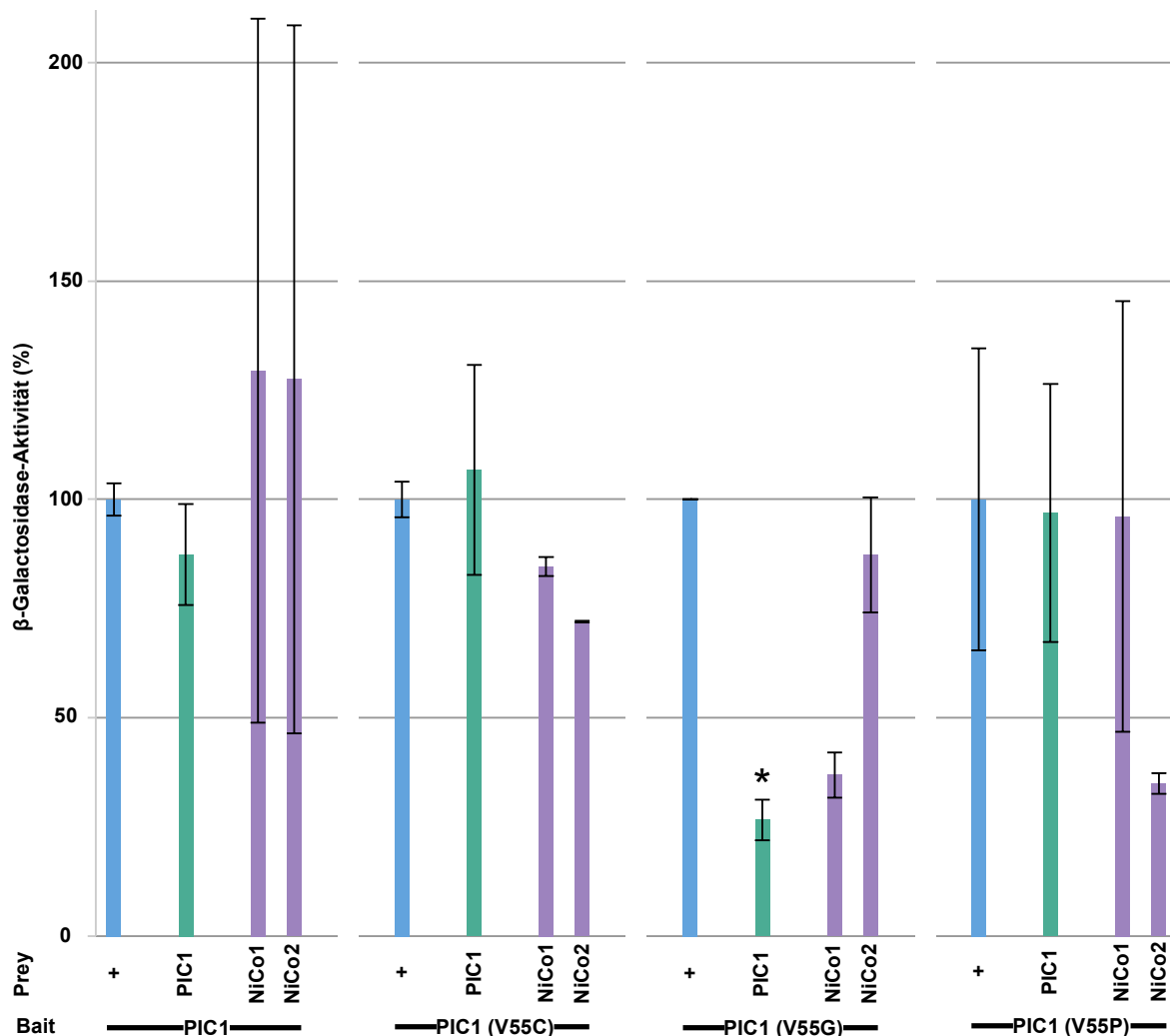


Abbildung 20: β-Galactosidase-Aktivität der Hefen des Split-Ubiquitin-Tests.

β-Galactosidase-Aktivität der Hefezellen mit PIC1 oder den PIC1 TonB-Box-Mutanten (V55C), (V55G) und (V55P) im Bait-Konstrukt und den Proteinen PIC1, NiCo1 und NiCo2 sowie der Positivkontrolle (+) im Prey-Konstrukt (n=2; für Bait/Prey Kombination PIC1/NiCo1, PIC1/NiCo2, PIC1 (V55G)/NiCo2 und PIC1 (V55P)/+: n=3; ± SA). Die Positivkontrolle (+) wurde gleich 100 % gesetzt und die Negativkontrolle auf 0 %, weswegen sie nicht aufgeführt ist. Die β-Galactosidase-Aktivität in Hefen mit der TonB-Box-Mutante V55G im Bait-Konstrukt, war signifikant verschieden zur β-Galactosidase-Aktivität in Hefen mit nicht mutiertem PIC1 im Bait-Konstrukt (P-Wert: * = p<0,05)

Für Hefen mit dem PIC1 Bait-Konstrukt, betrug die β-Galactosidase-Aktivität gemessen an der Positivkontrolle für das Prey-Konstrukt mit PIC1 87,4 % und für die beiden Proteine NiCo1 und NiCo2 129,5 bzw. 127,5 % (Abb. 20). Während die Interaktion mit PIC1 etwas schwächer ausfiel als bei der Positivkontrolle, schien PIC1 mit den beiden NiCo Proteinen stärker zu interagieren, wobei die β-Galactosidase-Aktivität im Vergleich zu PIC1 für NiCo1 und NiCo2 um den Faktor 1,5 erhöht war. Die einzig signifikante Änderung der β-Galactosidase-Aktivität bei Hefen mit PIC1 TonB-Box-Mutanten im Bait-Konstrukt,

bestand bei dem Bait/Prey-Paar PIC1 V55G/PIC1, wobei mit einer β -Galactosidase-Aktivität von 26,6 % gegenüber dem Bait/Prey-Paar PIC1/PIC1 eine Reduktion um den Faktor 0,3 auftrat (Abb. 20). All die anderen Hefen mit PIC1 TonB-Box-Mutanten im Bait-Konstrukt zeigten keine signifikant veränderte β -Galactosidase-Aktivität gegenüber den jeweiligen Bait/Prey-Paaren mit dem nicht mutierten PIC1 im Bait-Konstrukt. Jedoch zeichnet sich der Trend ab, dass die PIC1 TonB-Box-Mutanten V55C und V55P ebenfalls wie im Split-Ubiquitin-Test mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Konstrukt (Abb. 19), zu verstärkter Interaktion mit PIC1 führen. Im Hinblick auf die NiCo Proteine scheint die TonB-Box-Mutation V55G die Interaktion von PIC1 mit NiCo1 und die TonB-Box-Mutation V55P die Interaktion von PIC1 mit NiCo2 zu beeinträchtigen.

Neben PIC1 und den beiden NiCo Proteinen, wurden die Proteine YGGT-B, YGGT-C und TIC20 im Prey-Konstrukt ebenfalls auf Interaktion mit PIC1 über den β -Galactosidase-Assay getestet (Abb. 22).

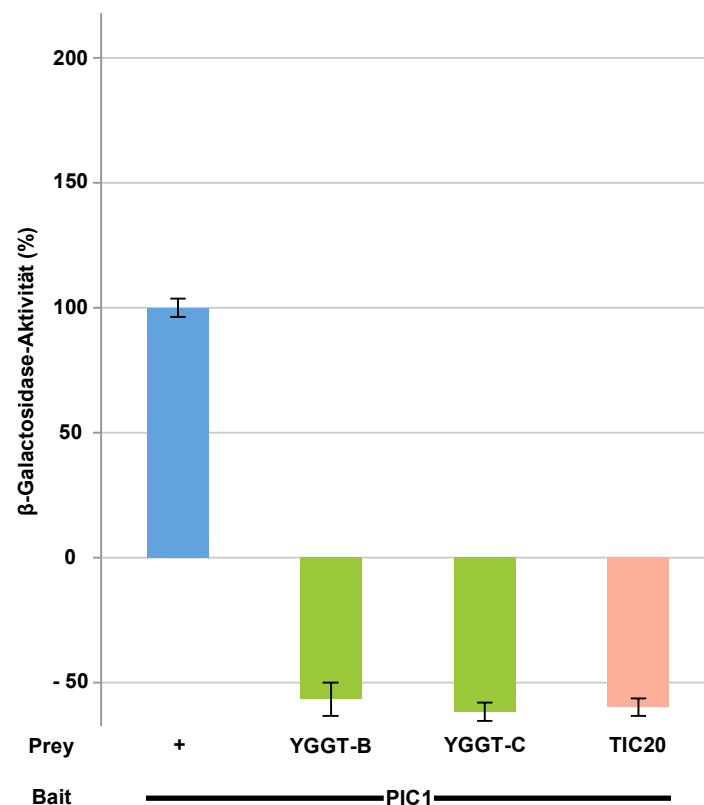


Abbildung 22: β -Galactosidase-Aktivität der Hefen des Split-Ubiquitin-Tests mit den Proteinen YGGT-B, YGGT-C und TIC20 im Prey-Konstrukt.

β -Galactosidase-Aktivität der Hefezellen mit PIC1 im Bait-Konstrukt und den Proteinen YGGT-B, YGGT-C und TIC20 sowie der Positivkontrolle (+) im Prey-Konstrukt (n=2; YGGT-C (Prey): n=3; \pm SA). Die Positivkontrolle (+) wurde gleich 100 % gesetzt und die Negativkontrolle auf 0 %, weswegen sie nicht aufgeführt ist.

Während für die Proteine PIC1, NiCo1 und NiCo2 eine jeweils hohe β -Galactosidase-Aktivität bestimmt werden konnte (Abb. 20), traten bei den Proteinen YGGT-B, YGGT-C und TIC20 negative Werte von - 56,8, - 61,7 und - 59,2 % auf. Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte über die Steigung in einem, für alle Proben gleichen Zeitintervall, in dem die β -Galactosidase-Aktivität linear zunahm. Für die Negativkontrolle, bei der keine β -Galactosidase-Aktivität auftritt, schwankt die Steigung bei der gewählten Messmethode generell geringfügig um den Nullpunkt. Im untersuchten Intervall der Messung war die Steigung für die Proteine YGGT-B, YGGT-C und TIC20 negativ, während die Steigung der Negativkontrolle positiv war. Die negativen Werte sind daher als ein Ausbleiben jeglicher β -Galactosidase-Aktivität und somit auch einer fehlenden Interaktion mit PIC1 zu werten.

V.4 Charakterisierung der *PIC1*, *NiCo1/2* und *YGGT-B/C* "knock down"-Mutanten

Die Eisenpermease der inneren Chloroplastenhüllmembran PIC1 spielt eine zentrale Rolle in der Eisenhomöostase der Pflanzen. *PIC1* "knock out"-Mutanten zeigen ein, im Vergleich zum Wildtyp, erheblich vermindertes Wachstum und weisen eine gestörte Blattmorphologie mit Defekten in der Chloroplastenentwicklung auf, was zu einem stark chlorotischen Phänotyp führt (Duy et al., 2007). Um die Proteine NiCo1/NiCo2 und YGGT-B/YGGT-C als mögliche Interaktionspartner von PIC1 und deren Funktion in der pflanzlichen Eisenhomöostase zu testen, wurden die jeweiligen "knock down"-Mutanten in *Arabidopsis* auf vergleichbare Phänotypen untersucht.

V.4.1 Charakterisierung der *YGGT-C* "knock down"-Mutante

Während "knock out"-Mutanten von *YGGT-B* in *Arabidopsis* keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp aufweisen (C. Vasquez-Robinet und K. Philippar, unveröffentlicht), sind "knock out"-Mutanten von *YGGT-C* jedoch embryolethal (Tzafrir et al., 2004; Kabeya et al., 2010). Daher wurde eine *YGGT-C* "knock down"-Mutante in *Arabidopsis* charakterisiert. Die *Arabidopsis*-Linie SAIL_1153_D08 trägt eine T-DNA-Insertion im 5'-UTR, 56 bp vor dem Exon. Die *yggc-c* Mutante wurde zur Phänotypisierung zusammen mit dem Wildtyp Col-0 auf Erde ausgesät (Abb. 23).



Abbildung 23: Phänotyp der YGGT-C "knock down"-Mutante.

Chlorotischer Phänotyp der YGGT-C "knock down"-Mutante (*ygg-t-c*) im Vergleich zum Wildtyp (Col-0), kultiviert auf Erde. (A) Die ersten beiden Rosettenblätter der zehn Tage alten Mutante *ygg-t-c* sind chlorotisch. (B) Vergleich aller Rosettenblätter der *ygg-t-c* Mutante mit denen des Wildtyps im 8-Blatt-Rosettenstadium. Die jüngeren Blätter der Mutante *ygg-t-c* sind chlorotisch, während die Chlorosen mit zunehmendem Alter der Blätter, schwächer ausgeprägt sind. (Bilder von C.-Vasquez-Robinet).

Die ersten beiden Rosettenblätter zehn Tage alter Sämlinge der *ygg-t-c* Mutante, wiesen im Gegensatz zum Wildtyp Chlorosen auf, die an der Blattbasis stärker ausgeprägt waren (Abb. 23A). Größenunterschiede der Blätter zwischen dem Wildtyp und der Mutante traten allerdings nicht auf. Ein Vergleich im 8-Blatt-Rosettenstadium zeigte, dass die Chlorosen der *ygg-t-c* Mutante bei jungen Blättern stärker ausgeprägt waren und mit zunehmenden Alter der Blätter kaum mehr wahrzunehmen waren (Abb. 23B). Dabei konzentrierten sich die chlorotischen Bereiche an der Blattbasis der Mutante. Die Blätter der Mutante zeigten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 zudem einen unregelmäßigeren Blattrand.

V.4.2 Charakterisierung der *PIC1*-, *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Phänotypen von Pflanzen mit gleichartigem Mutationshintergrund, wurden induzierbare RNAi-Linien verwendet. Dadurch ist sichergestellt, dass der "knock down" der Proteine in allen Mutanten durch den gleichen Mechanismus, unabhängig von Positionseffekten der T-DNA-Insertion, erzeugt wird. Außerdem ist der "knock down" dadurch beliebig zu bestimmten Zeitpunkten induzierbar und hat zum Beispiel bei Induktion im Rosettenblatt-Stadium keinen Einfluss auf die Keimung und die spätere Entwicklung der Pflanze, was eine unabhängige Untersuchung jedes Pflanzenstadiums ermöglicht. Um die Auswirkungen eines Verlustes der Proteine *PIC1*, *NiCo1*, *NiCo2*, *YGGT-B* und *YGGT-C* in *Arabidopsis* auf den Phänotyp untersuchen zu können, sind *nico1/2*- und *ygg-t-b/c*-Doppelmutanten nötig, da weder die *NiCo1* "knock out"-Mutante, noch die *YGGT-B* "knock out"-Mutante einen Phänotyp zeigen (Dissertation Roland Stübe, 2013; C. Vasquez-Robinet, unveröffentlicht). Daher wurde auf eine *nico1-1*(T-DNA)/*NiCo2*-RNAi-Doppelmutante, die ein *NiCo2* RNAi-Konstrukt im *NiCo1-1* "knock out"-Hintergrund trägt (im Folgenden *NiCo1/2*-RNAi), zurückgegriffen (Dissertation Roland Stübe, 2013). Für die phänotypischen Untersuchungen wurden *PIC1*-, *NiCo1/2*- (Dissertation Roland Stübe, 2013) und *YGGT-C*-RNAi-Linien verwendet. Eine *YGGT-B*-RNAi-Linie im *YGGT-C* "knock down"-Hintergrund wurde ebenfalls erzeugt, zeigte aber keinen von der *YGGT-C* "knock down"-Mutante abweichenden Phänotyp (Ergebnisse nicht gezeigt).

Für die Erzeugung der *PIC1*-, *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien wurde das pOpOff2-System gewählt, wobei sowohl eine pOpOff2-Transformationskassette mit dem pflanzlichen Selektionsmarker Hygromycin, als auch eine mit dem pflanzlichen Selektionsmarker Kanamycin verwendet wurde (Abb. 24).

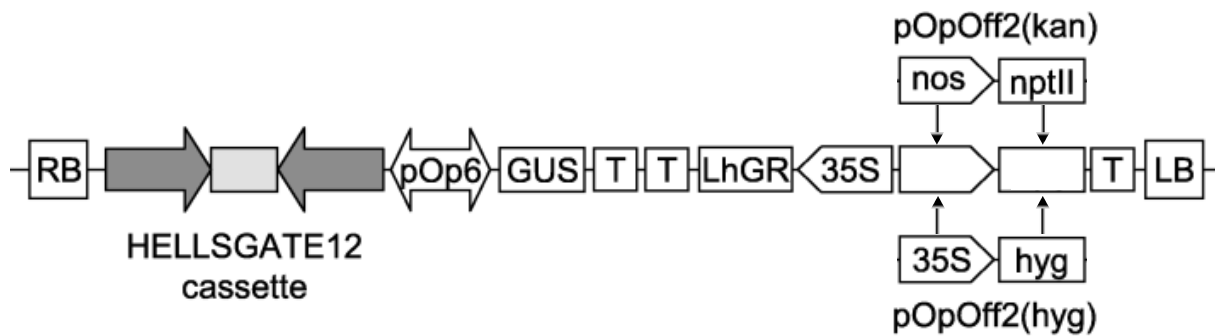


Abbildung 24: Der pOpOff2-Vektor.

Schematische Darstellung der pOpOff2-Transformationskassette mit den pflanzlichen Selektionsmarkern Hygromycin (pOpOff2[hyg]) und Kanamycin (pOpOff2[kan]). RB (Right Border) und LB (Left Border) flankieren die Grenzen der Kassette. Innerhalb der HELLSGATE12-Kassette befindet sich das Intron (graues Rechteck) und im Anschluss daran der induzierbare pOp6-Promotor. Des Weiteren sind das *GUS*-Reportergen, der Transkriptionsfaktor LhGR, der konstitutive Promotor 35S, die Resistenzmarker Hygromycin (hyg) und Kanamycin (nptII), Terminatoren (T) und im Falle der pOpOff2(kan) Kassette, der Nopalinsynthase-Promotor (nos) enthalten. Abbildung modifiziert nach Wielopolska et al. (2005).

Die Kassette trägt das RNAi-Konstrukt innerhalb der HELLSGATE12 Kassette und verfügt über den pOp6-Promotor. Dieser steht unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten LhGR Transkriptionsfaktors, welcher nur in Anwesenheit von Dexamethason aktiv ist. Die Kassette enthält außerdem das *GUS*-Reportergen (Wielopolska et al., 2005). Die beiden unabhängigen *PIC1*-RNAi-Linien 8.6 und 9.9 wurden mit dem pOpOff2(hyg) Vektor erzeugt (Tab. 8).

Tabelle 8: Die *PIC1*-, *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien:

Die RNAi-Linien enthalten einen pOpOff2-Vektor mit der jeweils vermittelnden Resistenz (hyg: Hygromycin, kan: Kanamycin). Die Vektoren beinhalten RNAi-Konstrukte mit DNA-Abschnitten (Insert) eines bestimmten Basenpaar-Bereichs (bp) der jeweiligen Gene (*PIC1*, *NiCo2*, *YGGT-C*). Die RNAi-Linien liegen in der T3- bzw. T4-Generation (Transformanten-Generation) entweder homozygot (ho) oder heterozygot (he) im Bezug auf das jeweilige RNAi-Konstrukt, vor (Genotyp).

Linien	Generation	Genotyp	Vektor	Gen	Insert
<i>pic1</i> 8.6	T3	ho	pOpOff2(hyg)	<i>PIC1</i>	bp 596 - 859
<i>pic1</i> 9.9	T3	ho			
<i>nico1/2</i> 4.1	T4	ho	pOpOff2(hyg)	<i>NiCo2</i>	bp 506 - 891
<i>nico1/2</i> 8.6	T4	ho	pOpOff2(kan)		
<i>yggt-c</i> 4.3	T4	ho	pOpOff2(kan)	<i>YGGT-C</i>	bp 1827 - 2016
<i>yggt-c</i> 10.10	T4	he			
<i>yggt-c</i> 13.7	T4	ho			

Das RNAi-Konstrukt enthält als Insert einen Abschnitt des *PIC1* Gens, welcher sich von den Basenpaaren 596 – 859 erstreckt. Die zwei unabhängigen *NiCo1/2*-RNAi-Linien 4.1 und 8.6 befinden sich im "knock out"-Hintergrund der Mutante *nico1-1* und wurden mit den Vektoren

pOpOff2(hyg) (Linie 4.1) und pOpOff2(kan) (Linie 8.6) erzeugt. Beide RNAi-Konstrukte enthalten als Insert den Abschnitt der Basenpaare 506 – 891 des *NiCo2* Gens. Die *PIC1*- und *NiCo1/2*-RNAi-Linien wurden von Roland Stübe während seiner Doktorarbeit erzeugt, wobei die *NiCo1/2*-Linien bereits homozygot in der T4-Generation vorlagen. Von den *PIC1*-Linien lagen mehrere Linien in der T3-Generation vor, die erst noch auf Homozygotie getestet werden mussten. Die Samen wurden auf Agar-Medium mit Hygromycin ausgesät und dadurch auf Homo- und Heterozygotie im Bezug auf die Transformationskassette selektiert, was in den homozygoten Linien 8.6 und 9.9 resultierte. Die *YGGT-C*-RNAi-Linien wurden komplett neu erzeugt. Hierfür wurde der pOpOff2(kan) Vektor gewählt, der als Insert den Abschnitt der Basenpaare 1827 – 2016 des *YGGT-C* Gens enthält. Die Linien 4.3, 10.10 und 13.7 wurden bis in die T4-Generation vermehrt, wobei die Linien 4.3 und 13.7 als homozygot im Bezug auf das RNAi-Konstrukt identifiziert wurden, während die Linie 10.10 heterozygot war. Die *YGGT-C*-RNAi-Linien waren an manchen der folgenden Experimente nicht involviert, da sie zum Zeitpunkt der Ausführung noch nicht zur Verfügung standen. Die Induktion des RNAi-Konstruktes wurde indirekt durch die Co-Expression des *GUS*-Reportergens getestet. Hierfür wurden Samen der *PIC1*-RNAi-Linien 8.6 und 9.9, der *NiCo1/2*-RNAi-Linien 4.1 und 8.6, sowie der Kontrolle Col-0 (Wildtyp) auf Agar-Medium mit Dexamethason ausgesät. Nach 11 Tagen erfolgte die GUS-Färbung (Abb. 25).

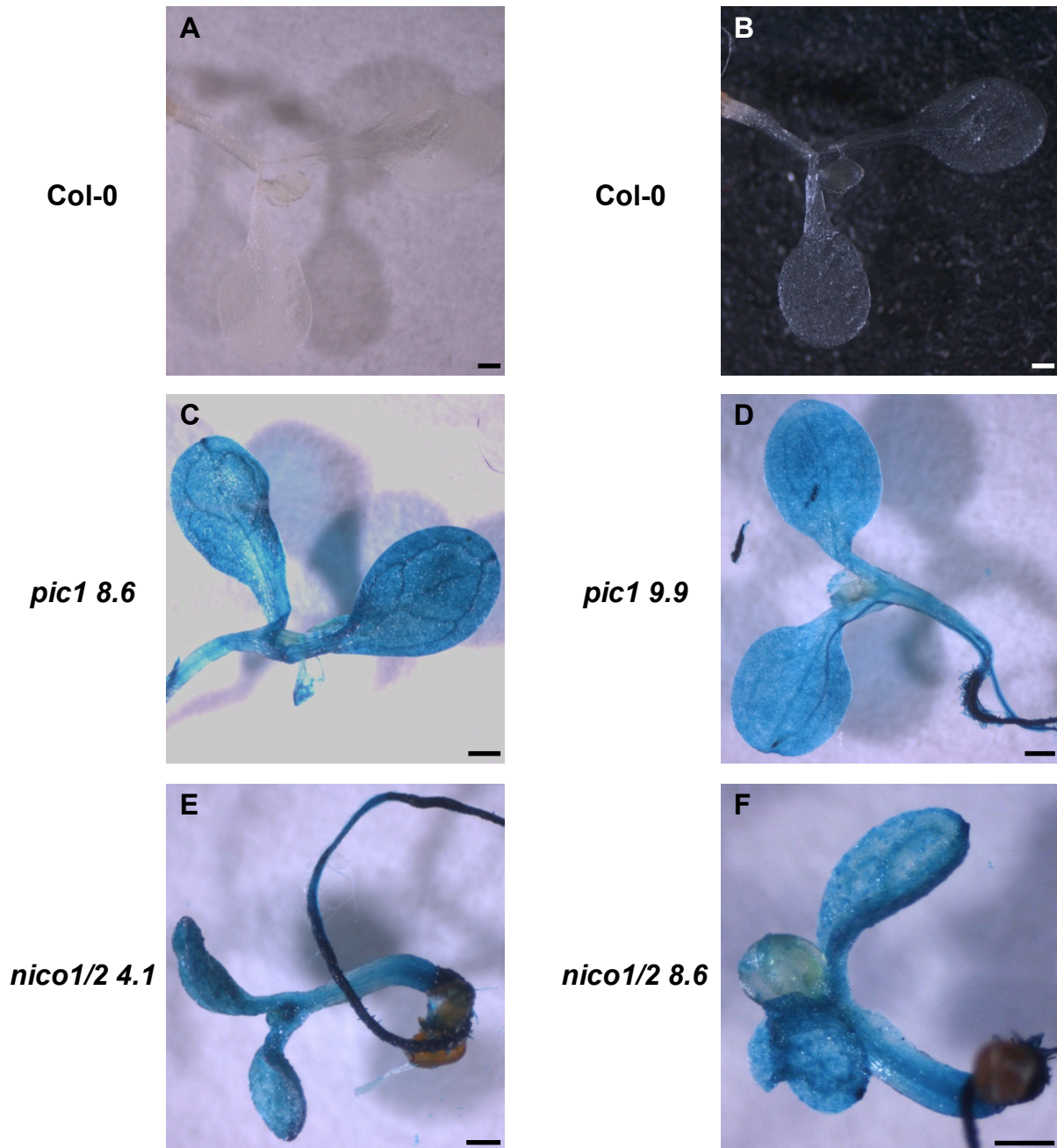


Abbildung 25: Nachweis positiver RNAi-Transformanten durch GUS-Färbung.

GUS-Färbung 11 Tage alter Pflanzen des Wildtyps (Col-0, **A**; **B**) und der RNAi-Linien *pic1* 8.6 (**C**) und *pic1* 9.9 (**D**) sowie *nico1/2* 4.1 (**E**) und *nico1/2* 8.6 (**F**), kultiviert auf Agarmedium mit 10 μ M Dexamethason. Der Maßstab entspricht 1 mm.

Der Wildtyp Col-0 wies keine Blaufärbung auf (Abb. 25A und B). Die beiden *PIC1*-RNAi-Linien (Abb. 25C und D) und die beiden *NiCol1/2*-RNAi-Linien (Abb. 25E und F) hingegen waren stark blau gefärbt, was auf eine Induktion des RNAi schließen lässt.

Für den direkten Nachweis einer Induktion der RNAi-Konstrukte und somit einem dadurch verursachten "knock down" der jeweiligen Proteine, wurden Samen der *PIC1*-RNAi-Linie 9.9

und der *NiCol1/2*-RNAi-Linie 4.1 sowohl auf Agar-Medium ohne Dexamethason, als auch auf Agar-Medium mit Dexamethason ausgesät. Zur Kontrolle des RNAi erfolgte zusätzlich die Aussaat des Wildtyps Col-0 und der RNAi-Linie *luc*. Die Linie *luc* enthält ein Luciferase-Konstrukt im RNAi-Vektor pOpOff2(kan) und zeigt daher trotz RNAi-Induktion keinen vom Wildtyp verschiedenen Phänotyp. Diese Linie dient somit als Kontrolle dafür, ob eine Reduktion des jeweiligen Proteingehaltes tatsächlich auf einen spezifischen "knock down" des codierenden Gens oder auf den RNAi-Vektor selbst zurückzuführen ist. Nach sieben Tagen wurde die RNA isoliert und die *PIC1*- bzw. *NiCo2*-Transkriptgehalte mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 26 und 27).

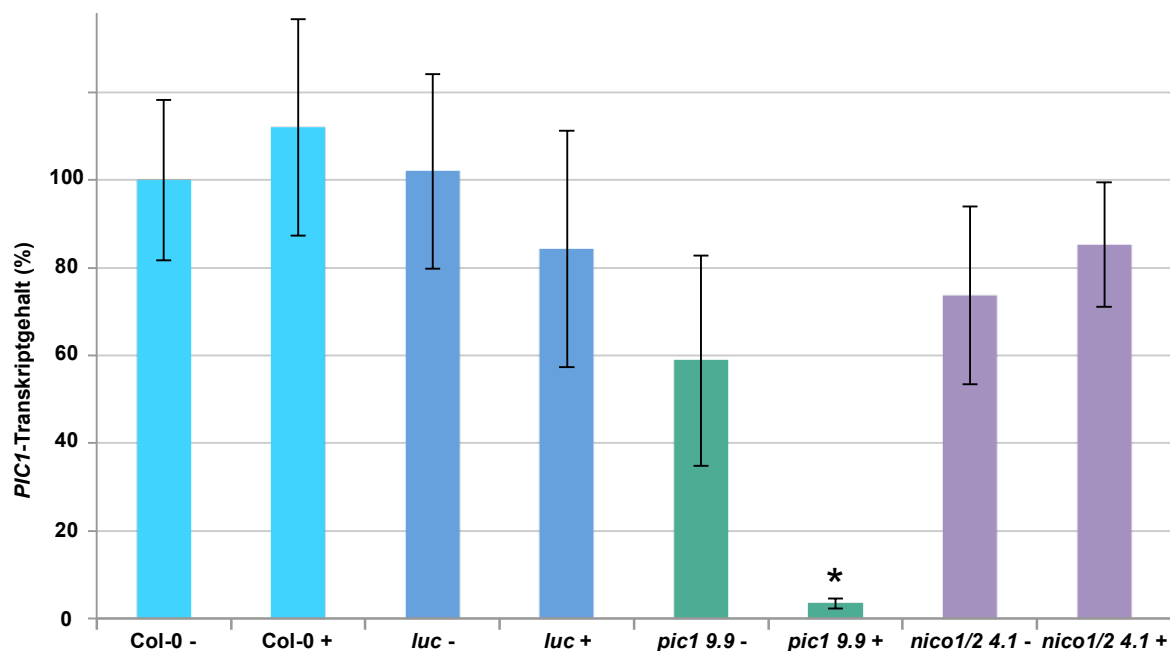


Abbildung 26: *PIC1*-Transkriptgehalte der RNAi-Linien.

Quantifizierung der *PIC1*-Transkriptgehalte sieben Tage alter Sämlinge nach Aussaat auf Agar-Medium ohne (-) oder mit (+) 10 μ M Dexamethason (n=3; für *pic1* 9.9 -: n=4; \pm SA). Getestet wurden die beiden Kontrollen Col-0 und die RNAi-Linie *luc*, sowie die beiden RNAi-Linien *pic1* 9.9 und *nico1/2* 4.1. Gegenüber der nicht induzierten Linie *pic1* 9.9, war der *PIC1*-Transkriptgehalt in der Linie *pic1* 9.9 nach Induktion des RNAi signifikant reduziert (P-Wert: * = $p < 0,05$).

Der *PIC1*-Transkriptgehalt in der induzierten *PIC1*-RNAi-Linie 9.9 betrug 3,4 % des *PIC1*-Transkriptgehaltes des Wildtyps Col-0 welcher auf Agar-Medium ohne Dexamethason wuchs und 5,7 % der nicht induzierten *PIC1*-RNAi-Linie (Abb. 26). In den Kontrollen Col-0 und *luc*, sowie der *NiCol1/2*-RNAi-Linie 4.1 die mit Dexamethason wuchsen, konnte keine signifikante Veränderung des *PIC1*-Transkriptgehaltes gegenüber Pflanzen, die ohne Dexamethason wuchsen, festgestellt werden.

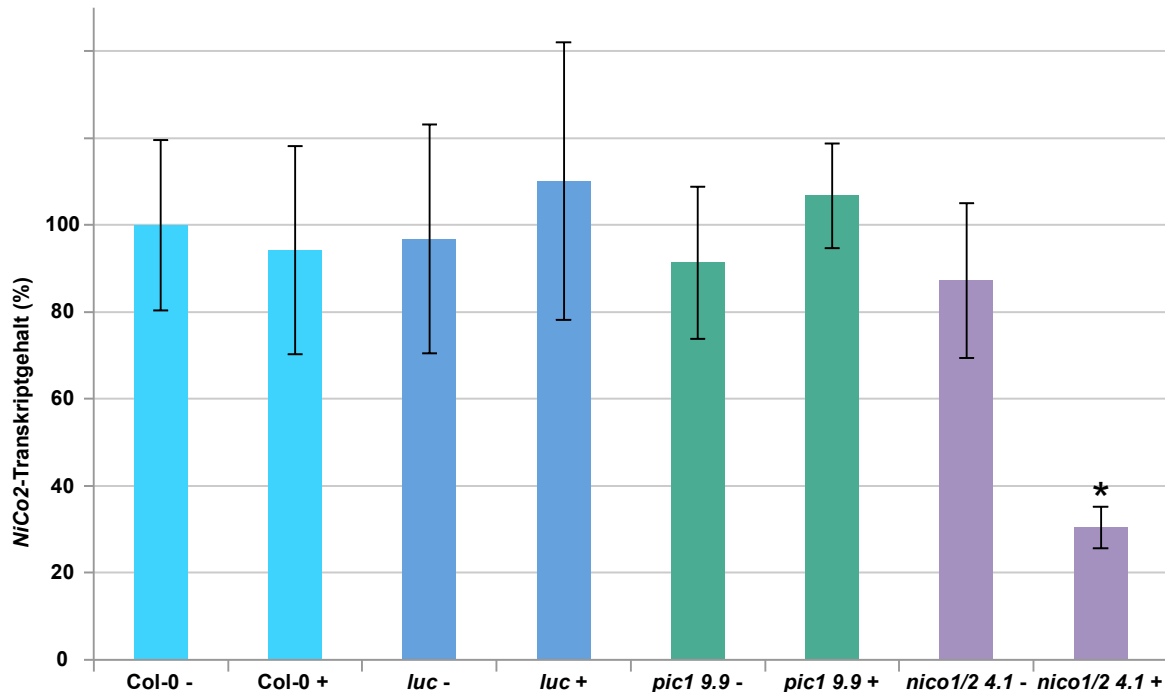


Abbildung 27: NiCo2-Transkriptgehalte der RNAi-Linien.

Quantifizierung der *NiCo2*-Transkriptgehalte sieben Tage alter Sämlinge nach Aussaat auf Agar-Medium ohne (-) oder mit (+) 10 μ M Dexamethason (n=3; \pm SA). Getestet wurden die beiden Kontrollen Col-0 und die RNAi-Linie *luc*, sowie die beiden RNAi-Linien *pic1* 9.9 und *nico1/2* 4.1. Gegenüber der nicht induzierten Linie *nico1/2* 4.1, war der *NiCo2*-Transkriptgehalt in der Linie *nico1/2* 4.1 nach Induktion des RNAi signifikant reduziert (P-Wert: * = $p < 0,05$).

In der induzierten *NiCo1/2*-RNAi-Linie *nico1/2* 4.1 konnte ein *NiCo2*-Transkriptgehalt von 30,5 % des *NiCo2*-Transkriptgehaltes der Kontrolle Col-0, die auf Agar-Medium ohne Dexamethason wuchs, gemessen werden (Abb. 27). Im Vergleich zur nicht induzierten *NiCo1/2*-RNAi-Linie, enthielt die induzierte Mutante 34,9 % des *NiCo2*-Transkriptgehaltes. Wie auch bei der Messung der *PIC1*-Transkriptgehalte, zeigten sich hier keine signifikanten Veränderungen in den Kontrollen oder der *PIC1*-RNAi-Linie die mit Dexamethason wuchsen, gegenüber Pflanzen, die ohne Dexamethason wuchsen.

Für den direkten Nachweis der RNAi-Induktion in der *YGGT-C*-RNAi-Linie *yggc-c* 10.10, wurden Samen dieser Linie zusammen mit Samen der Kontrollen Col-0 und *luc* in Hydrokultur ausgesät. Nach 16 Tagen wurden die Pflanzen in Nährlösung mit Dexamethason bzw. ohne Dexamethason überführt und die RNA nach fünf weiteren Tagen isoliert, bevor die *YGGT-C*-Transkriptgehalte durch qRT-PCR ermittelt wurden (Abb. 28).

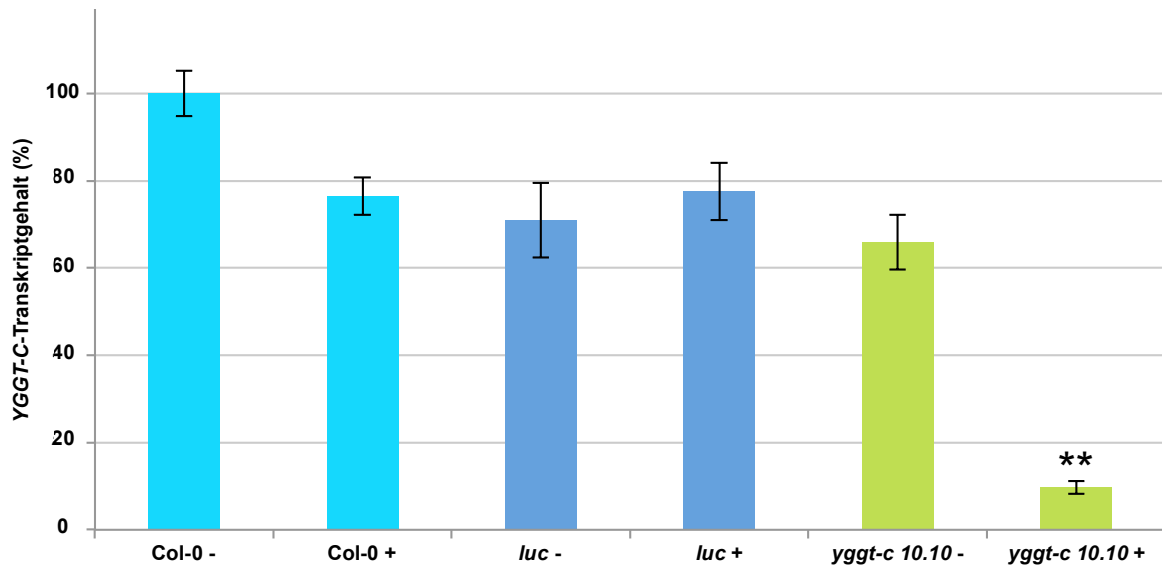


Abbildung 28: YGGT-C-Transkriptgehalte der RNAi-Linien.

Quantifizierung der YGGT-C-Transkriptgehalte 21 Tage alter Pflanzen, nach fünf Tagen in Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 μ M Dexamethason zur Induktion des RNAi. (n=3; für *yggc-10.10* +:N=4; \pm SA). Getestet wurden die beiden Kontrollen Col-0 und die RNAi-Linie *luc*, sowie die RNAi-Linie *yggc-10.10*. Gegenüber der nicht induzierten Linie *yggc-10.10*, war der YGGT-C-Transkriptgehalt in der Linie *yggc-10.10* nach Induktion des RNAi signifikant reduziert (P-Wert: ** = $p < 0,005$).

In der induzierten YGGT-C-Linie wurde ein YGGT-C-Transkriptgehalt gemessen, der 9,7 % des YGGT-C-Transkriptgehaltes der Kontrolle Col-0, die auf Agar-Medium ohne Dexamethason wuchs und 14,8 % der nicht induzierten YGGT-C-Linie entsprach. Die YGGT-C-Transkriptgehalte der Kontrollen die mit Dexamethason wuchsen, waren gegenüber den YGGT-C-Transkriptgehalten der Pflanzen die ohne Dexamethason wuchsen, nicht signifikant verändert.

V.4.3 Phänotypische Charakterisierung der RNAi-Linien im Sämlingsstadium

Samen der *PIC1*- und der *NiCol1/2*-RNAi-Linien sowie der Kontrollen Col-0 und *luc* wurden auf Agar-Medium mit bzw. ohne Dexamethason ausgesät und am siebten Tag phänotypisch untersucht (Abb. 29).

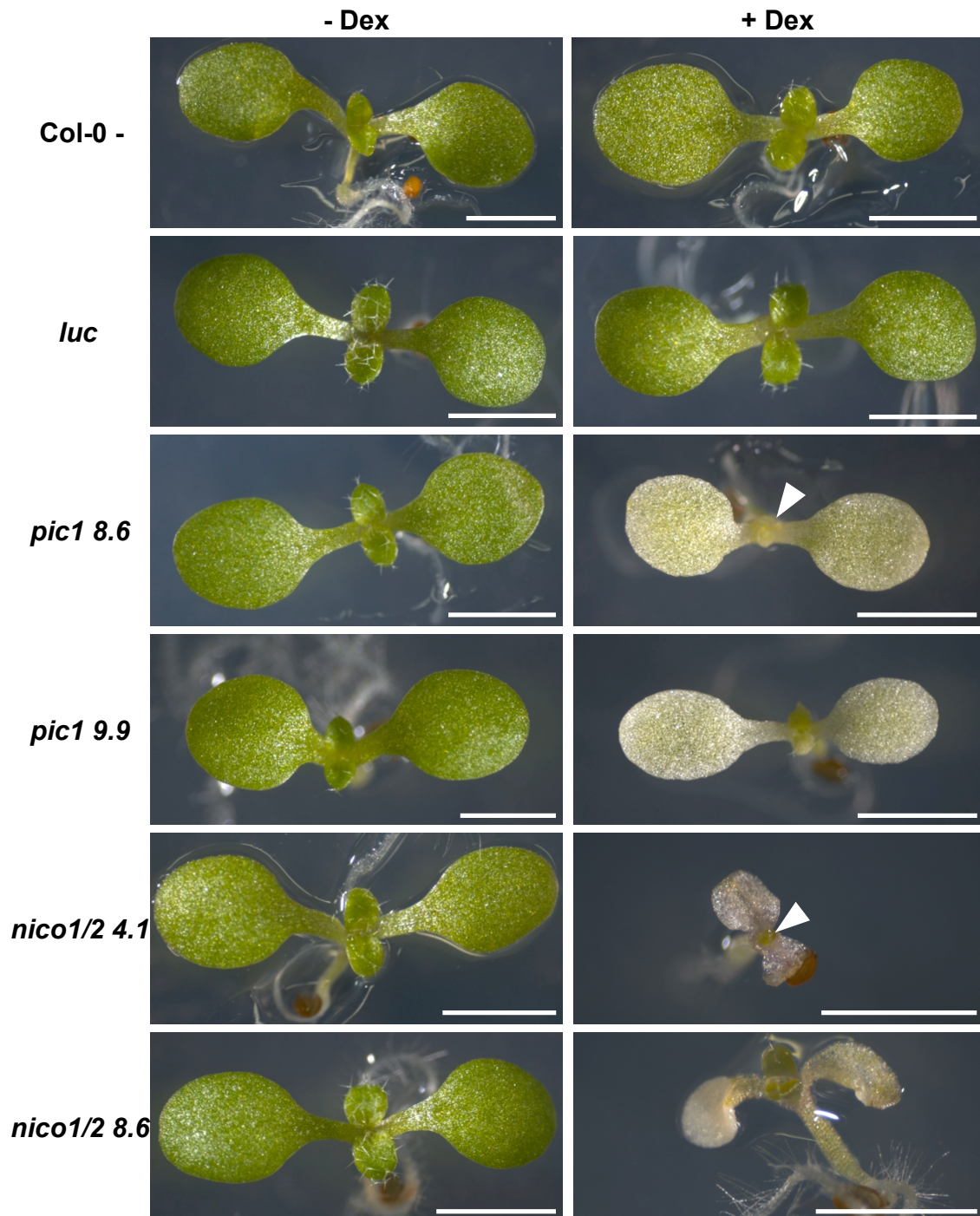


Abbildung 29: Phänotyp der RNAi-Linien nach Induktion auf Agar-Medium.

Phänotyp sieben Tage alter Sämlinge der Kontrollen Col-0 und *luc*, sowie der RNAi-Linien *pic1* 8.6 und *pic1* 9.9 als auch *nico1/2* 4.1 und *nico1/2* 8.6, kultiviert auf Agar-Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 μ M Dexamethason zur Induktion des RNAi. Die weiße Pfeilspitze zeigt auf das erste Rosettenblattpaar. Der Maßstab entspricht 5 mm.

Der Wildtyp Col-0 und die RNAi-Kontroll-Linie *luc* wiesen nach Kultur mit Dexamethason, keinen vom Wildtyp nach Kultur ohne Dexamethason abweichenden Phänotyp auf. Die induzierten RNAi-Linien *pic1 8.6* und *pic1 9.9* zeigten allerdings stark chlorotische Kotyledonen und auch die sich entwickelnden ersten Rosettenblattpaare, wiesen starke Chlorosen auf. Diese Pflanzen waren jedoch lediglich geringfügig kleiner, als die Pflanzen der gleichen Linien ohne Induktion des RNAi und der Kontrollen. Im Entwicklungsstadium schienen die induzierten *PIC1*-Linien nicht zurückzuliegen. Bei den induzierten RNAi-Linien *nico1/2 4.1* und *nico1/2 8.6* zeigte sich ebenfalls ein stark chlorotischer Phänotyp, welcher noch wesentlich stärker ausgeprägt war als bei induzierten Pflanzen der *PIC1*-Linien. Neben den Chlorosen, erreichten die Pflanzen zudem nur einen Bruchteil der Größe nicht induzierter Pflanzen, waren stark deformiert und vermutlich aufgrund von Anthocyanakkumulation leicht rötlich gefärbt. Dennoch entwickelten diese stark geschädigten Pflanzen bereits das erste, weniger chlorotische Rosettenblattpaar und befanden sich somit im gleichen Entwicklungsstadium wie die Pflanzen der anderen Linien.

Samen der *YGGT-C*-RNAi-Linien *yggt-c 4.1* und *yggt-c 10.10*, sowie der Kontrollen Col-0 und der RNAi-Linie *pic1 9.9*, wurden ebenso auf Agar-Medium mit Dexamethason bzw. ohne Dexamethason ausgesät und der Phänotyp am siebten Tag untersucht (Abb. 30).

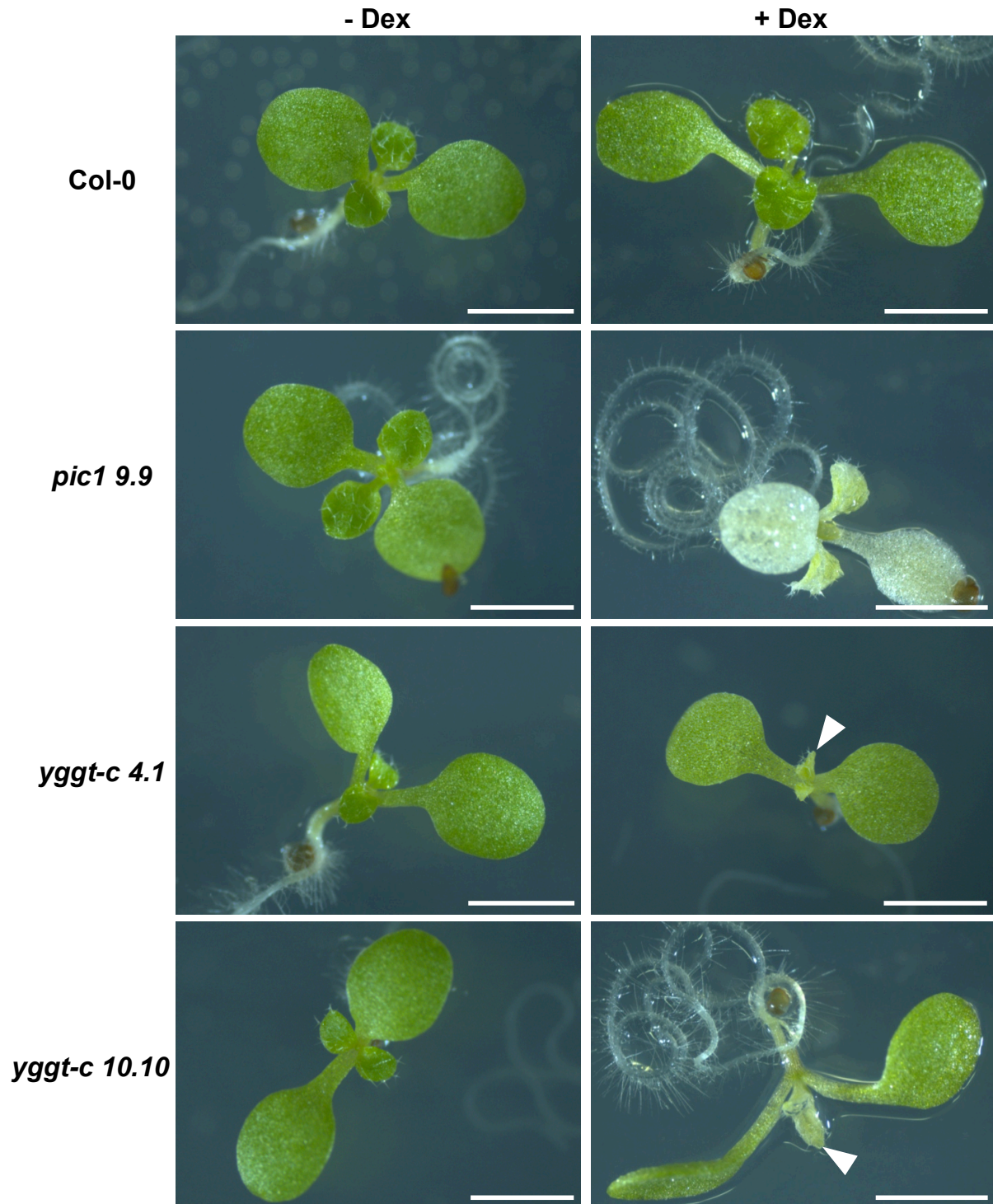


Abbildung 30: Phänotyp der YGGT-C-RNAi-Linien nach Induktion auf Agar-Medium.

Phänotyp sieben Tage alter Sämlinge der Kontrolle Col-0, sowie der RNAi-Linien *pic1* 9.9, *yggc-c* 4.1 und *yggc-c* 10.10, kultiviert auf Agar-Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 µM Dexamethason zur Induktion des RNAi. Die weiße Pfeilspitze zeigt auf das erste Rosettenblattpaar. Der Maßstab entspricht 5 mm.

Der Wildtyp Col-0 wies auch diesmal nach Kultur mit Dexamethason, keinen vom Wildtyp nach Kultur ohne Dexamethason abweichenden Phänotyp auf. Die Positivkontrolle *pic1* 9.9 zeigte nach Induktion des RNAi hingegen ihren charakteristischen, chlorotischen Phänotyp. Die ersten beiden Rosettenblätter der beiden induzierten *YGGT-C*-RNAi-Linien waren schmaler und maximal halb so groß wie jene der jeweiligen nicht induzierten Linien, spitz zulaufend und wiesen Chlorosen auf. Die Kotyledonen waren hingegen lediglich etwas heller als die der nicht induzierten Pflanzen, aber ansonsten gleich groß.

Der Großteil des Eisens in Pflanzen befindet sich in den Chloroplasten und ist dort essentieller Bestandteil der Elektronen-Transportkette der Photosynthese in den Thylakoiden. Da bereits gezeigt wurde, dass der Verlust der Eisenpermease PIC1 eine gestörte Organisation des Mesophyllgewebes und eine starke Beeinträchtigung des Thylakoidsystems zur Folge hat (Duy et al., 2007b), wurde die Blattmorphologie der RNAi-Linien *pic1* 9.9, *nico1/2* 4.1 und *nico1/2* 8.6 näher untersucht. Von Kotyledonen sieben Tage alter Sämlinge wurden Querschnitte angefertigt und lichtmikroskopisch analysiert (Abb. 31).

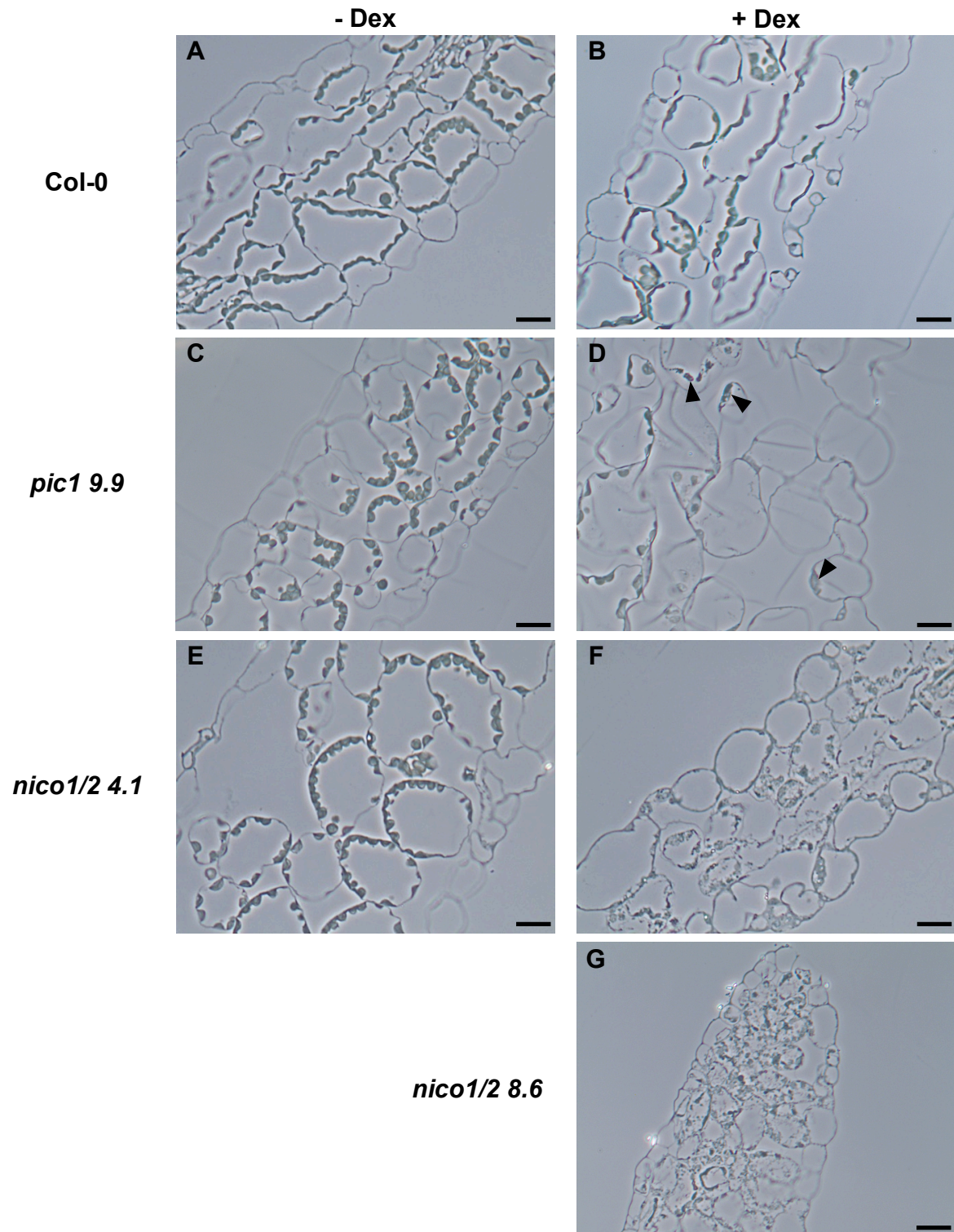


Abbildung 31: Blattquerschnitte der *PIC1*- und *NiCo1/2*-RNAi-Linien.

Untersuchung der Blattquerschnitte von Kotyledonen sieben Tage alter Sämlinge der Kontrolle Col-0 sowie der RNAi-Linien *pic1 9.9* als auch *nico1/2 4.1* und *nico1/2 8.6*, kultiviert auf Agar-Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 μ M Dexamethason zur Induktion des RNAi. Fotografiert unter einem Axiophot Lichtmikroskop. Pfeilspitze: geschädigte Chloroplasten. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

Im Vergleich zum Wildtyp Col-0, waren bei den induzierten RNAi-Linien (Abb. 31B, D, F und G) die Zellen des Mesophylls kleiner und kaum mehr in Palisaden- und Schwammparenchym differenziert. Außerdem enthielten sie weit weniger Chloroplasten als die Zellen nicht induzierter Pflanzen (Abb. 31C und E) und des Wildtyps Col-0 (Abb. 31A). Während bei der induzierten *pic1 9.9* Mutante (Abb. 31D) sowohl Zellen mit scheinbar intakten Chloroplasten, als auch welche ohne intakte Chloroplasten vorhanden waren, schienen keine Chloroplasten der *nico1/2* Mutanten (Abb. 31F und G) intakt zu sein. Zusätzlich zur lichtmikroskopischen Untersuchung, wurden die Zellen der RNAi-Linien mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop analysiert (Abb. 32).

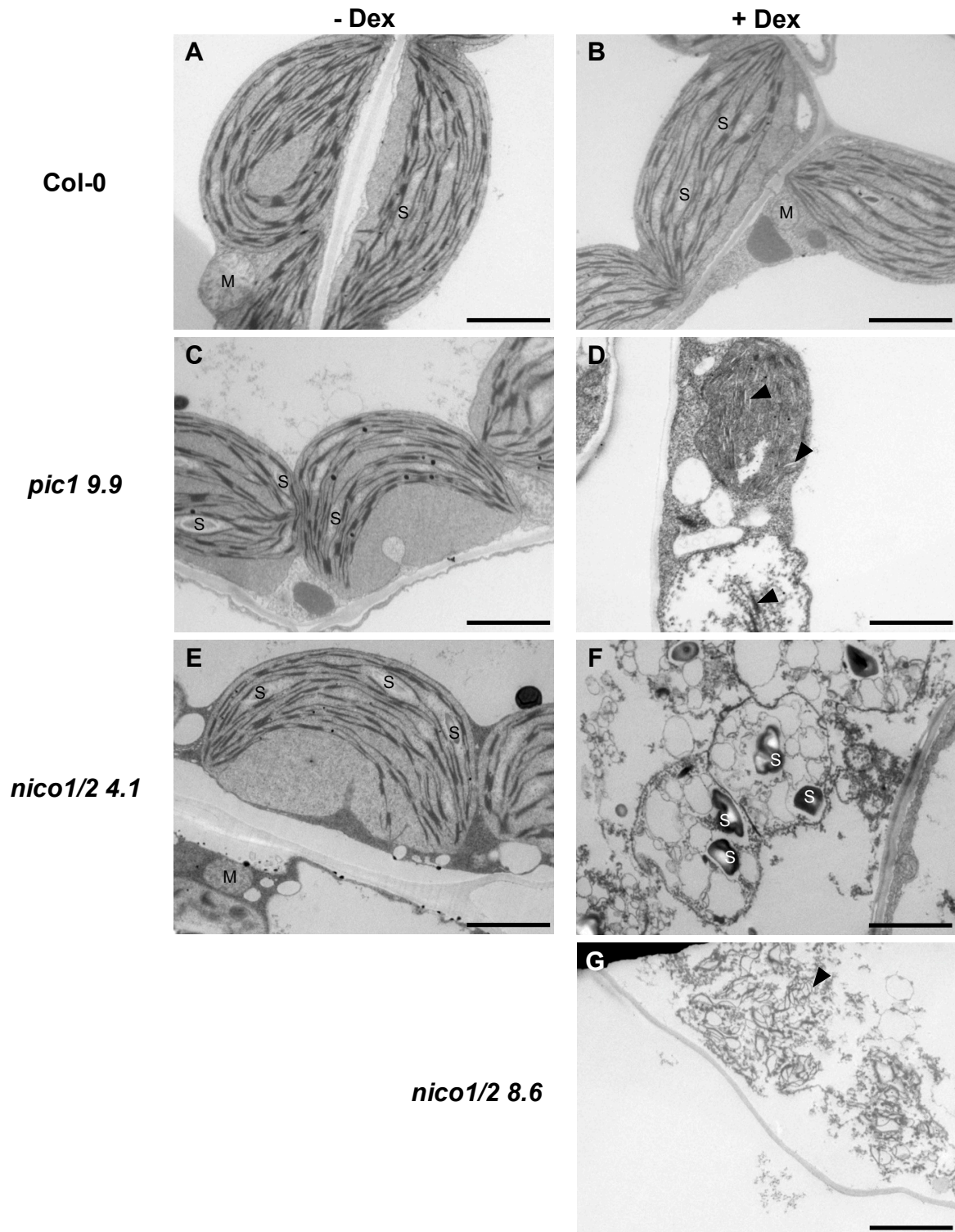


Abbildung 32: Ultrastruktur von Plastiden der *PIC1*- und *NiCo1/2*-RNAi-Linien.

Untersuchung der Ultrastruktur von Kotyledonen sieben Tage alter Sämlinge der Kontrolle Col-0 sowie der RNAi-Linien *pic1 9.9* als auch *nico1/2 4.1* und *nico1/2 8.6*, kultiviert auf Agar-Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 μ M Dexamethason zur Induktion des RNAi. Fotografiert unter einem Transmissions-Elektronenmikroskop. M: Mitochondrien, S: Stärkekörner, Pfeilspitze: degradierte Thylakoide. Der Maßstab entspricht 2 μ m.

In den Zellen der Mutante *pic1 9.9* (Abb. 32D) fanden sich degradierte Chloroplasten, wobei von den Thylakoiden oft nur noch Reststrukturen zu erahnen waren und Grana-Stapel teilweise komplett fehlten. Wie die vorangehenden Untersuchungen der beiden *NiCo1/2*-Linien nahe legten (Abb. 29 und 31), waren auch deren Chloroplasten stärker betroffen. In beiden Linien waren keine intakten Chloroplasten mit einer definierten Umgrenzung durch äußere und innere Hüllmembranen vorhanden (Abb. 32F und G). In Zellen der induzierten *nico1/2 4.1* Mutante war auch die Thylakoidstruktur nicht mehr zu erkennen (Abb. 32F). Die induzierte Mutante *nico1/2 8.6* hatte dagegen noch stark degradierte Thylakoide (Abb. 32G). Generell waren die Chloroplasten der induzierten RNAi-Linien *pic1 9.9*, *nico1/2 4.1* und *nico1/2 8.6* kleiner, als in nicht induzierten Mutanten und der Kontrolle. Stärkekörner waren sowohl in Pflanzen die mit Dexamethason wuchsen, als auch in Pflanzen die ohne Dexamethason wuchsen, vorhanden. Der Verlust der Proteine PIC1, NiCo1 und NiCo2 hatte somit im Sämlingsstadium starke Auswirkungen auf die Intaktheit der Chloroplasten.

V.4.4 Hydrokulturansatz zur Anzucht von *Arabidopsis*

Die Kultur von *Arabidopsis* auf Agar-Medium ist für Analysen im Sämlingsstadium ausreichend, darüber hinaus allerdings in ihren Anwendungsmöglichkeiten limitiert. Den Pflanzen ist meist zu wenig Platz geboten um sich natürlich entwickeln zu können und das Medium ist nur schlecht austauschbar. Die gleichmäßige Applikation von Dexamethason ist daher ausschließlich beim Gießen des Mediums möglich. Die Induktion des RNAi erfolgt somit von der Keimung an und spätere Entwicklungsstadien können nicht untersucht werden. Die Wurzeln sind während der Tagphase ebenfalls dem Licht ausgesetzt, was unnatürlichen Bedingungen entspricht. Außerdem wachsen die Pflanzen permanent unter sterilen Bedingungen in einem abgeschlossenen System und sind daher auch einer relativ hohen Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Um die Analyse von *Arabidopsis* in allen Entwicklungsstadien zufriedenstellend gewährleisten zu können, wurde ein Hydrokulturansatz entwickelt (Abb. 33).

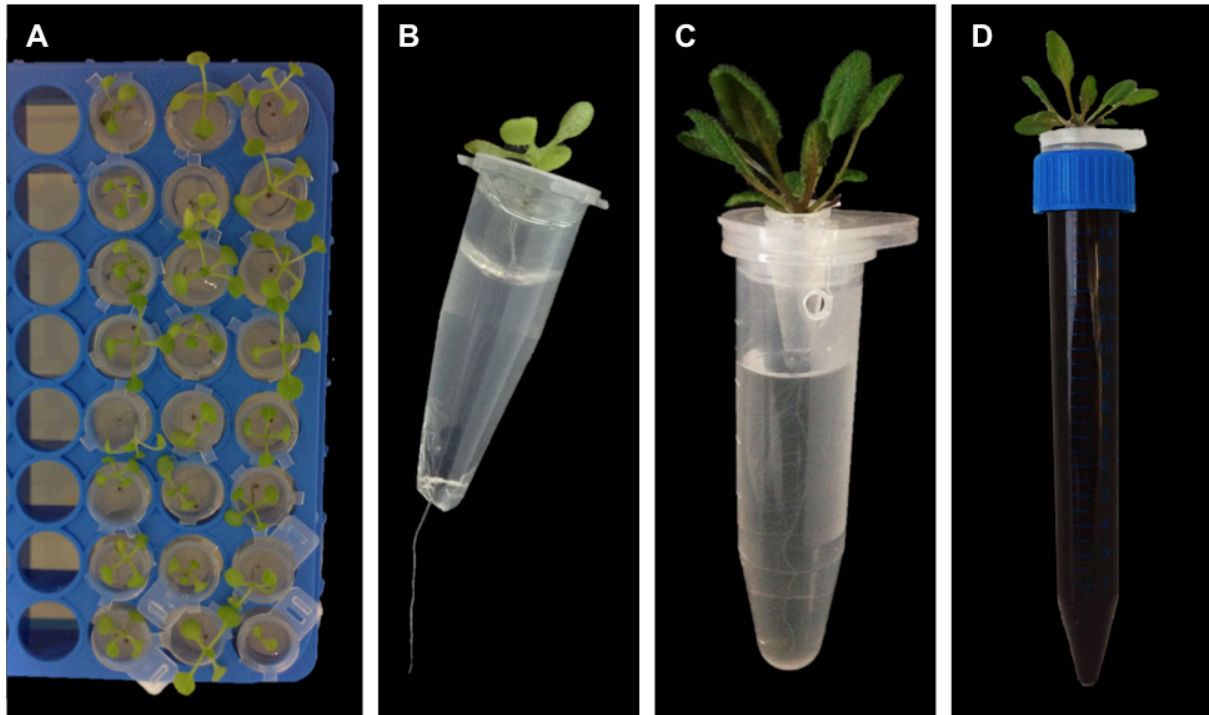


Abbildung 33: Hydrokultursystem Aufbau 1.

(A) Die Aussaat erfolgte in, mit Agar-Medium gefüllten, 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen mit Loch im Boden, die in Nährlösung hingen. (B) Am Tag 8 nach der Aussaat wuchsen die Wurzeln der Sämlinge bereits aus der Öffnung am Boden des Reaktionsgefäßes und die Pflanzen wurden mitsamt des PCR-Reaktionsgefäßes in ein 5 ml Reaktionsgefäß durch ein Loch im Deckel, in Nährlösung überführt (C). Zur Aufrechterhaltung eines bestimmten Flüssigkeitsstandes, befand sich im 5 ml Reaktionsgefäß ein Loch durch welches Flüssigkeit pipettiert werden konnte. (D) Das 5 ml Reaktionsgefäß wiederum wurde in ein lichtundurchlässiges 15 ml Falcon-Tube durch ein Loch in dessen Deckel überführt, um die Abwesenheit von Licht im Wurzelbereich zu imitieren.

Dabei wurde der Boden von 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen abgeschnitten um eine Öffnung zu erhalten, durch welche die Wurzeln hindurchwachsen konnten. Die Gefäße wurden mit Agar-Medium gefüllt, die Samen darauf ausgesät und die Gefäße in ein lichtundurchlässiges Gefäß gestellt, welches Nährlösung enthielt (Abb. 33A). Am achten Tag nach der Aussaat waren die Wurzeln der Sämlinge bereits durch das Agar-Medium und das Loch im Boden der PCR-Reaktionsgefäße hindurch, in die Nährlösung gewachsen (Abb. 33B). Anschließend wurden die Sämlinge mitsamt des PCR-Reaktionsgefäßes durch eine Aussparung im Deckel eines 5 ml Reaktionsgefäßes welches Nährlösung enthielt, in dieses überführt (Abb. 33C). In den 5 ml Reaktionsgefäßen befand sich im oberen Bereich ein kleines Loch, durch welches mit einer Pipette Flüssigkeit verabreicht werden konnte, um einen bestimmten Pegel des Mediums aufrecht zu erhalten. Um die Wurzeln bestmöglich von Licht abzuschirmen, wurden die 5 ml Reaktionsgefäße durch ein Loch im Deckel in lichtundurchlässige 15 ml Gefäße gestellt (Abb. 33D).

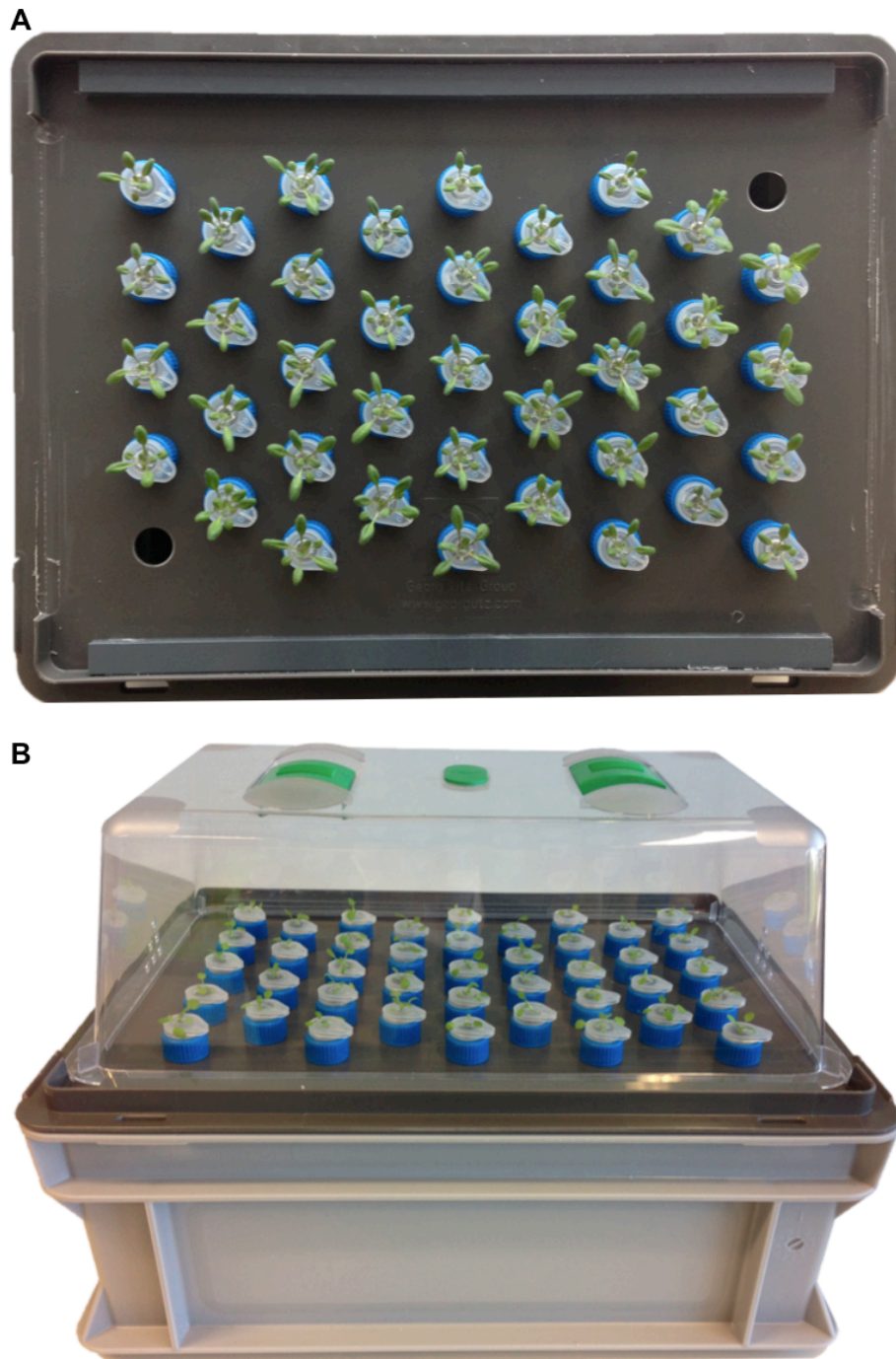


Abbildung 34: Hydrokultursystem Aufbau 2.

(A) Die lichtundurchlässigen Falcon-Tubes wurden durch Bohrungen im Deckel einer lichtdichten Stapelbox gehängt. (B) Der Deckel mit den 15 ml Falcon-Tubes wurde in die zugehörige, lichtdichte Stapelbox gestellt und mit einer lichtdurchlässigen Kunststoffhaube zur Aufrechterhaltung einer höheren Luftfeuchtigkeit abgedeckt.

Zur Aufstellung wurden diese 15 ml Gefäße wiederum durch Aussparungen im Deckel einer lichtdichten Stapelbox, in diese gestellt (Abb. 34A). Zur Aufrechterhaltung eventuell erwünschter steriler Bedingungen oder einer hohen Luftfeuchtigkeit, konnte diese Stapelbox mit einer Lichtdurchlässigen Kunststoffhaube abgedeckt werden (Abb. 34B). Die Applikation genau definierter Lösungen war nun zu jedem Zeitpunkt möglich, wobei jede Pflanze identischen Bedingungen ausgesetzt werden konnte. Jede Pflanze wuchs separat und nahezu unabhängig von benachbarten Pflanzen heran und auch die Ernte der Wurzeln war nun leichter möglich. Die Pflanzen, welche in diesem Hydrokulturansatz heranwuchsen, waren unter Standardbedingungen mit Pflanzen die auf Erde heranwuchsen, vergleichbar.

V.4.5 Phänotypische Untersuchung der RNAi-Linien im Rosettenblatt-Stadium

Pflanzen der *PIC1*-, *NiCol/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien wurden zusammen mit den Kontrollen Col-0 und *luc* in Hydrokultur angezogen und am 21. Tag, fünf Tage nach Induktion des RNAi durch Dexamethason, im Rosettenblatt-Stadium untersucht (Abb. 35).

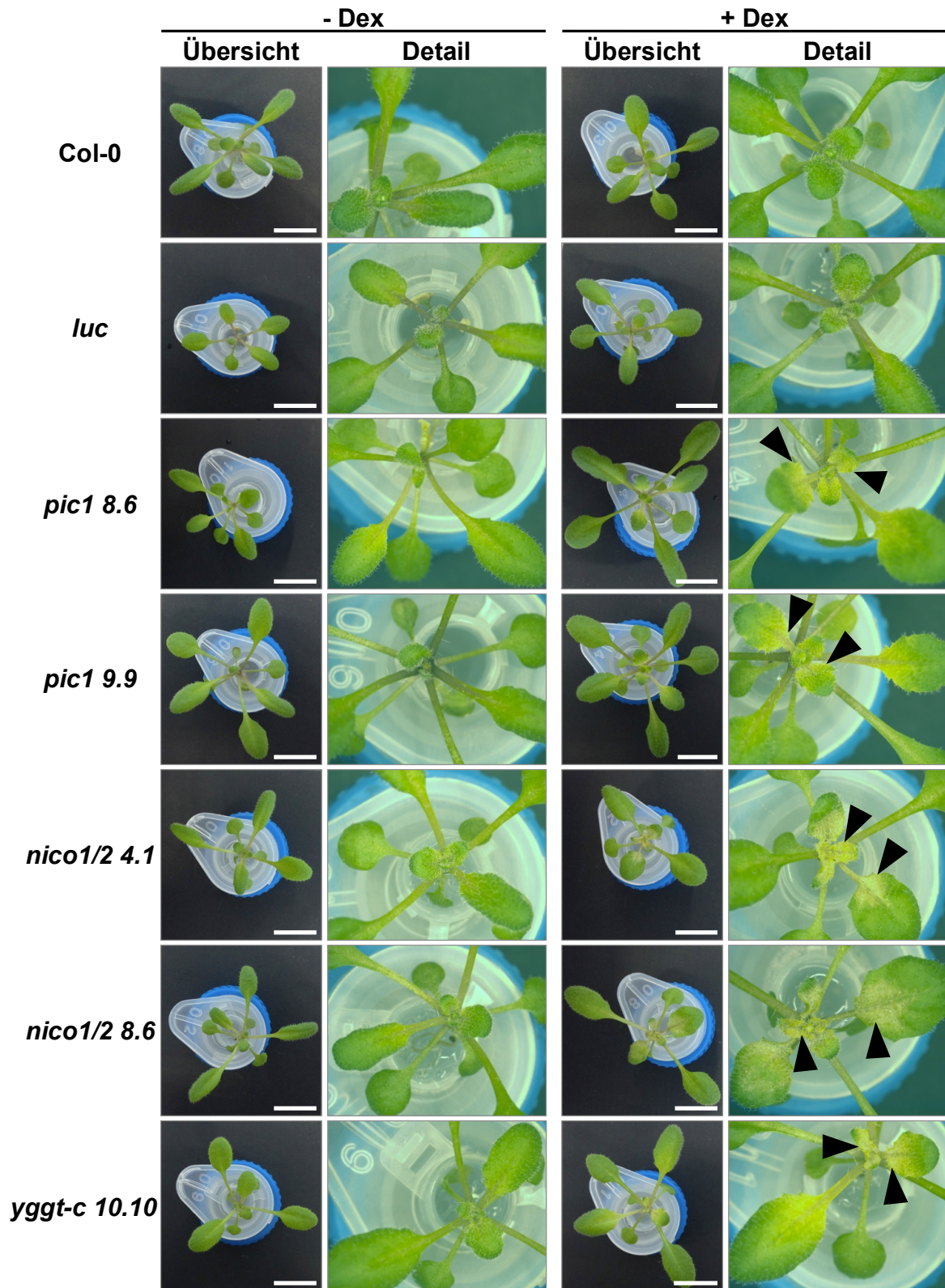


Abbildung 35: Phänotyp der RNAi-Linien in Hydrokultur.

Phänotyp 21 Tage alter Pflanzen der Kontrollen Col-0 und *luc* sowie der RNAi-Linien *pic1 8.6*; *pic1 9.9*; *nico1/2 4.1*; *nico1/2 8.6* und *yggc-c 10.10*, nach fünf Tagen in Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 μ M Dexamethason zur Induktion des RNAi. Die schwarzen Pfeilspitzen zeigen auf die Chlorosen. Der Maßstab entspricht 1 cm.

Die phänotypische Untersuchung der *PIC1*-, *NiCol1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien zeigte, dass die jungen, noch im Wachstum befindlichen Blätter am fünften Tag nach Induktion des RNAi chlorotisch waren. Dabei schienen sich die Chlorosen von der Blattbasis zur Blattspitze hin auszubreiten, wobei sie bei den älteren Blättern nur bis maximal zur Blattmitte reichten und sich mit abnehmendem Alter der Blätter, zunehmend bis zur Blattspitze hin ausbreiteten. Wie bereits im Sämlingsstadium (Abb. 29 und 30) waren die Chlorosen bei den Linien *nico1/2 4.1* und *nico1/2 6.8* stärker ausgeprägt als bei den Linien *pic1 8.6* und *pic1 9.9*. Auch die Blattstruktur der beiden *NiCol1/2*-Linien schien stärker beeinträchtigt zu sein, da die jüngsten Blätter leichte Deformationen aufwiesen, während dieser Effekt bei den *PIC1*-Linien nicht zu beobachten war. Was das Ausmaß der Chlorosen und der Blattdeformation betraf, nahm die Linie *yggc-c 10.10* eine Zwischenstellung zwischen den *PIC1*- und den *NiCol1/2*-Linien ein. Die Wildtyp-Pflanzen Col-0 und die Pflanzen der RNAi-Kontroll-Linie *luc*, zeigten am fünften Tag nach Verabreichung von Dexamethason keine Chlorosen oder sonst eine phänotypische Abweichung von den Pflanzen, welchen kein Dexamethason verabreicht wurde. Abweichungen in der Größe und des Entwicklungsstadiums der Pflanzen, sind auf eine natürliche Schwankung zurückzuführen, da die Pflanzen in Abbildung 35 exemplarisch die jeweiligen Linien repräsentieren und es bei jeder Linie, unabhängig von der Verabreichung von Dexamethason, unterschiedlich entwickelte Pflanzen gab.

Wie auch beim Sämlingsstadium wurde die Blattmorphologie der RNAi-Linien im Rosettenblatt-Stadium lichtmikroskopisch untersucht. Dazu wurden fünf Tage nach Verabreichung von Dexamethason, Blatt-Querschnitte junger Blätter 21 Tage alter Pflanzen angefertigt (Abb. 36 und 37).

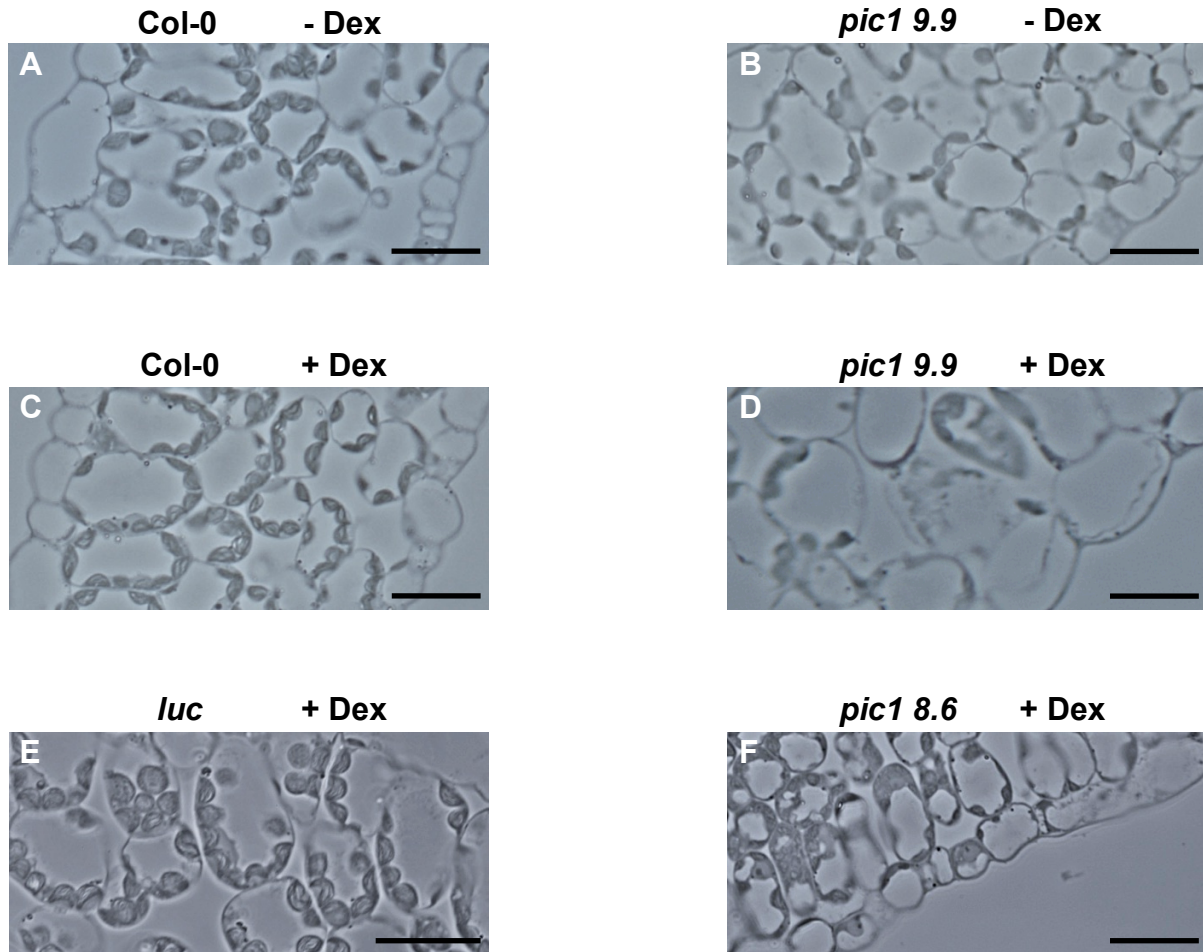


Abbildung 36: Blattquerschnitte der *PIC1*-RNAi-Linien.

Untersuchung der Blattquerschnitte von Rosettenblättern 21 Tage alter Pflanzen der Kontrollen Col-0 und *luc* sowie der RNAi-Linien *pic1 8.6*; *pic1 9.9*, nach fünf Tagen in Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 μ M Dexamethason zur Induktion des RNAi. Fotografiert unter einem Axiophot Lichtmikroskop. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

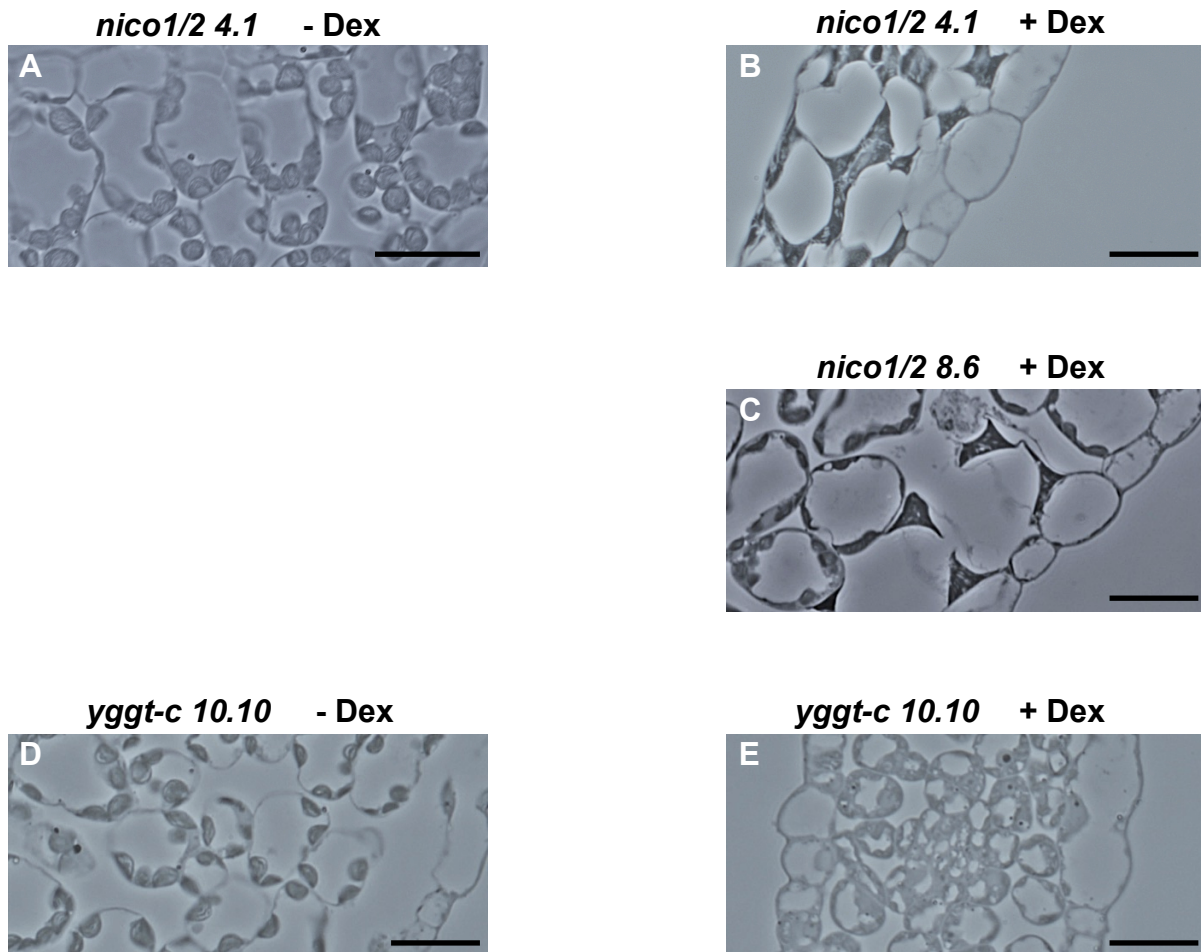


Abbildung 37: Blattquerschnitte der *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien.

Untersuchung der Blattquerschnitte von Rosettenblättern 21 Tage alter Pflanzen der RNAi-Linien *nico1/2 4.1*, *nico1/2 8.6* und *yggt-c 10.10*, nach fünf Tagen in Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 µM Dexamethason zur Induktion des RNAi. Fotografiert unter einem Axiophot Lichtmikroskop. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Im Gegensatz zum Sämlingsstadium (Abb. 31), waren keine deutlichen Größenunterschiede der Zellen zwischen induzierten und nicht induzierten Mutanten bzw. der Kontrollen feststellbar. Lediglich die Zellen der induzierten Mutante *yggt-c 10.10* waren geringfügig kleiner (Abb. 37E) als die Zellen der anderen Linien. Die Mesophyllzellen der induzierten Mutanten *nico1/2 4.1* (Abb. 37B), *nico1/2 8.6* (Abb. 37C) und *yggt-c 10.10* (Abb. 37E) waren allerdings auch im Rosettenblatt-Stadium nicht eindeutig in Palisaden- und Schwammparenchym differenziert. Auch enthielten die induzierten *PIC1*-, *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien weniger Chloroplasten pro Zelle. Die Chloroplasten der induzierten Mutanten *nico1/2 4.1* (Abb. 37B) und *nico1/2 8.6* (Abb. 37C) waren kleiner und zudem stärker betroffen als jene der induzierten *PIC1*-Linien (Abb. 36D und F). In der induzierten RNAi-Linie *pic1 9.9* befanden sich neben Zellen mit geschädigten Chloroplasten ebenfalls Zellen, die intakte Chloroplasten enthielten (Abb. 36D), was bereits in Blattquerschnitten

dieser Linie im Sämlingsstadium beobachtet werden konnte (Abb. 31D). In den Zellen der induzierten *YGGT-C*-Linie *yggt-c 10.10* (Abb. 37E), waren die Chloroplasten deutlich kleiner als bei der nicht induzierten Mutante. Außerdem nahmen die Vakuolen weniger Raum ein und das Cytoplasma schien körnige Bestandteile zu enthalten, was auch bei der induzierten Mutante *pic1 8.6* (Abb. 36F) beobachtet werden konnte.

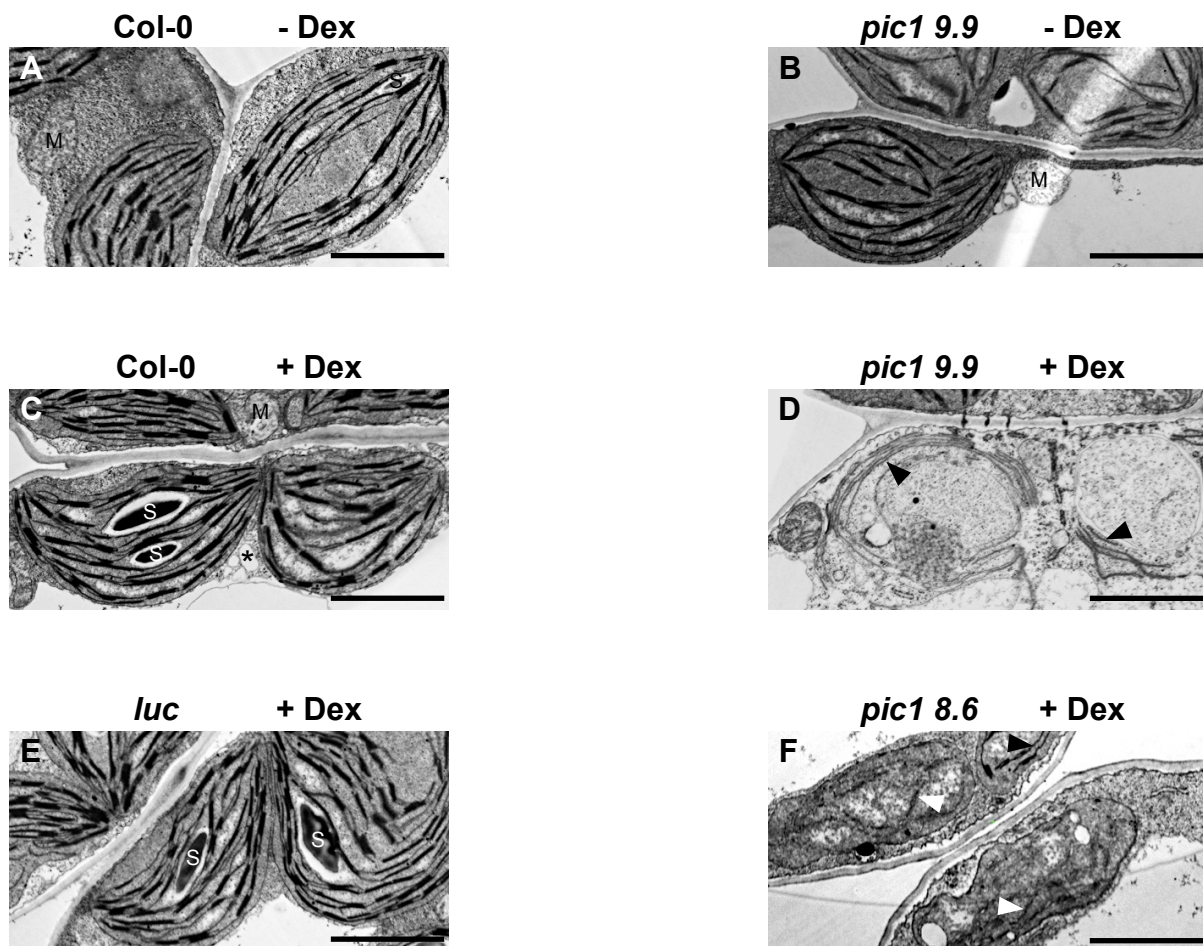


Abbildung 38: Ultrastruktur von Plastiden der *PIC1*-RNAi-Linien.

Untersuchung der Ultrastruktur von Rosettenblättern 21 Tage alter Pflanzen der Kontrollen Col-0 und *luc* sowie der RNAi-Linien *pic1 9.9* als auch *pic1 8.6*, nach fünf Tagen in Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 µM Dexamethason zur Induktion des RNAi. Fotografiert unter einem Transmissions-Elektronenmikroskop. M: Mitochondrien, S: Stärkekörner, Pfeilspitze: degradierte Thylakoide. Der Maßstab entspricht 2 µm.

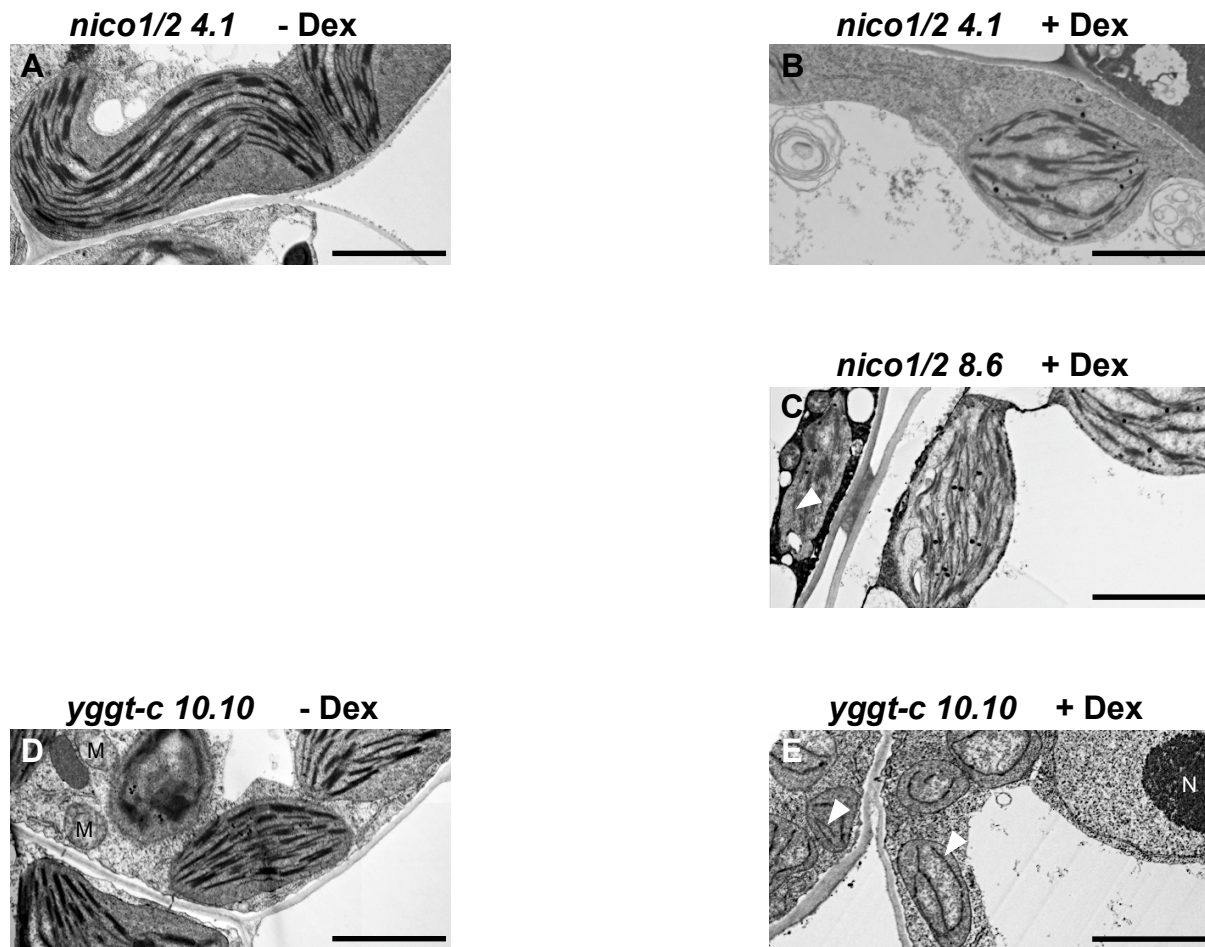


Abbildung 39: Ultrastruktur von Plastiden der *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien.

Untersuchung der Ultrastruktur von Rosettenblättern 21 Tage alter Pflanzen der RNAi-Linien *nico1/2 4.1*, *nico1/2 8.6* und *yggt-c 10.10*, nach fünf Tagen in Medium ohne (- Dex) oder mit (+ Dex) 10 µM Dexamethason zur Induktion des RNAi. Fotografiert unter einem Transmissions-Elektronenmikroskop. M: Mitochondrien, N: Nukleus, Pfeilspitze: degradierte Thylakoide. Der Maßstab entspricht 2 µm.

Die Analyse der Ultrastruktur von Plastiden der Pflanzen im Rosettenblatt-Stadium mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop zeigte, dass die induzierten *PIC1*-Linien auch in diesem Entwicklungsstadium Zellen mit degradierten Chloroplasten besaßen (Abb. 38D und F). Im Gegensatz zum Sämlingsstadium enthielten die induzierten *NiCo1/2*-Linien klar umgrenzte Chloroplasten, die allerdings kleiner waren als jene in nicht induzierten Pflanzen und auch die Thylakoide waren geschädigt oder zumindest beeinträchtigt (Abb. 39B und C). Wie auch schon unter dem Lichtmikroskop zu sehen (Abb. 37E), waren die Chloroplasten der induzierten *yggt-c 10.10* Mutante deutlich kleiner als die der nicht induzierten Mutante (Abb. 39D und E). Die Thylakoide waren alle stark degradiert beziehungsweise lediglich rudimentär entwickelt und das Cytoplasma war dichter gepackt mit körnigen Strukturen, welche die Chloroplasten umgaben. Die Auswirkungen des "knock downs" war in diesem

Entwicklungsstadium somit vergleichbar mit jenen im Sämlingsstadium, obgleich die Effekte bei den induzierten *NiCo1/2*-Linien weniger stark ausgeprägt waren.

VI Diskussion

In Chloroplasten spielt Eisen aufgrund seines Redoxpotentials in der Elektronentransportkette der Photosynthese eine entscheidende Rolle. Allerdings ist Eisen im Chloroplasten nicht nur an physiologisch relevanten Prozessen beteiligt, sondern birgt in freier, ionischer Form durch die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies auch Gefahren, weshalb die Eisenhomöostase generell eine entscheidende Rolle in Pflanzen einnimmt. Die Identifikation und Charakterisierung aller daran beteiligten Komponenten ist daher eine wichtige Aufgabe. Der korrekte Import des Eisens in Chloroplasten stellt dabei einen Teilaspekt dar, wobei die Permease PIC1 als erstes Eisentransportprotein der inneren Chloroplastenhüllmembran (IE = inner envelope) beschrieben wurde (Duy et al., 2007). Als mögliche Interaktionspartner des Proteins PIC1 wurden zudem die Proteine NiCo und YGGT identifiziert (Dissertation Roland Stübe, 2013). Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Protein HI1 als möglicher Bestandteil der pflanzlichen Eisenhomöostase untersucht. Außerdem wurde die Interaktion und Komplexbildung von PIC1, NiCo und YGGT getestet, sowie deren Funktion in der Pflanze auf phänotypischer Ebene charakterisiert.

VI.1 HI1, ein potentieller Regulator der Eisenhomöostase in Pflanzen

Das Protein HI1 gilt als potentieller Regulator der Eisenhomöostase in Pflanzen, wobei eine Lokalisation in den Chloroplasten vorhergesagt wird (ARAMEMNON, Schwacke et al. 2003). Mittels GFP-Targeting wurde daher die subzelluläre Lokalisation von AtHI1 untersucht, eine chloroplastidäre Lokalisation konnte jedoch bisher nicht bestätigt werden (siehe Abb. 8). Auch deckten sich die GFP-Signale nicht mit den für Mitochondrien spezifischen Signalen. Vielmehr schien AtHI1-GFP unspezifische Aggregate im Cytosol von Tabakprotoplasten zu bilden, weshalb die subzelluläre Lokalisation bisher nicht geklärt ist. In früheren Versuchen war auch die Lokalisation von AtNiCo1 durch GFP-Targeting in Tabakprotoplasten nicht möglich, gelang aber unter Zuhilfenahme des p19-Helferplasmids (siehe Abb. 10). Ob weitere Experimente mit AtHI1 zusammen mit dem p19-Helferplasmid erfolgsversprechend wären, ist unklar. Im Fall von *AtNiCo1-GFP* schien die transiente Expression in Tabak inhibiert worden zu sein, was durch das p19-Helferplasmid umgangen werden konnte, da es das posttranskriptionelle Gen-"Silencing" unterbindet (Voinnet et al., 2003). Die transiente Expression des *AtHI1-GFP*-Konstruktes in Tabak war jedoch erfolgreich und die GFP-Signalstärke sehr stark ausgeprägt. Möglicherweise aber kann

AtHI1-GFP in Tabak nicht an den Ort seiner Bestimmung transportiert werden und bildet stattdessen Aggregate im Cytosol. Eine Lokalisation über Immunoblot-Analysen könnte daher Aufschluss über die tatsächliche subzelluläre Lokalisation des Proteins HI1 geben.

Die Expression von *HII* ist mit einer Reihe von Genen der pflanzlichen Eisenhomöostase co-reguliert, welche Funktion HI1 innerhalb der Pflanze übernimmt ist jedoch noch nicht geklärt. Bei Kultivierung unter Standardbedingungen zeigte die T-DNA-Insertionslinie *hi1#1* keinen vom Wildtyp Col-0 abweichenden Phänotyp. Eventuell kommt die Funktion von HI1 aber erst bei Eisenstress zum tragen. *HII* unterliegt offenbar der Kontrolle des Eisenmangel-Transkriptionsfaktors FIT1 (Fe-deficiency induced transcription factor 1) und ist bei Eisenmangel im Wildtyp mehr als doppelt so stark hochreguliert wie in der *fit1* Mutante (Colangelo und Guerinot, 2004). Aber auch bei Eisenüberschuss könnte HI1 für die Eisenhomöostase in der Pflanze relevant sein, da die Expression von *HII* zusammen mit der Expression von *FRO1-3*, *IRT1-2* und *IREG2*, Genen die Eisenhomöostase-Proteine codieren, bei Zinküberschuss hochreguliert wurde (Van De Mortel et al., 2006). Daher wäre eine Phänotypisierung der *hi1#1* Mutante sowohl bei Eisenmangel als auch Eisenüberschuss interessant. Die T-DNA inseriert allerdings vor dem Transkriptionsstart von *HII* und hat daher möglicherweise keinen, bzw. keinen nennenswerten Einfluss auf den *HII*-Transkriptgehalt, was erst noch mittels qRT-PCR getestet werden müsste. Neben der Phänotypisierung der T-DNA-Insertionslinien von *HII*, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere unabhängige *HII*-RNAi-Linien erzeugt. Diese RNAi-Linien liegen nun in der T2-Generation vor und können auf einen Phänotyp hin untersucht werden, um Aufschluss über die Funktion von HI1 in Pflanzen zu geben.

VI.2 Die Proteine PIC1, NiCo und YGGT bilden einen Komplex

Frühere Ergebnisse von Split-Ubiquitin-Tests in Hefe deuten darauf hin, dass PIC1, NiCo und YGGT einen Komplex bilden, der als Metalltranslocon der inneren Chloroplastenhüllmembran fungieren könnte. Die Verifizierung der Hypothese einer Komplexbildung erfolgte über die native Fraktionierung der Proteinkomplexe des IE aus Erbse. In zwei voneinander unabhängigen Ansätzen einer Fraktionierung der IE über Dichtegradientenzentrifugation wurde gezeigt, dass die drei Proteine PsPIC1, PsNiCo und PsYGGT ihre Akkumulationsmaxima in den selben Fraktionen hatten (siehe Abb. 12 und 13). Da sich Proteine eines nativ aufgereinigten Komplexes stets in den selben Fraktionen befinden sollten, ist davon auszugehen, dass die Proteine PsPIC1, PsNiCo und PsYGGT Untereinheiten eines gemeinsamen Komplexes sind. In der zweiten Dimension einer

"Blue-Native"-PAGE/SDS-PAGE trennten sich die Proteine PsPIC1, PsNiCo und PsYGGT untereinander aus einem Komplex, bei ca. 90 kDa der ersten Dimension auf (siehe Abb. 14). Das Kontrollprotein PsTIC110 ist Bestandteil eines von PsPIC1, PsNiCo und PsYGGT unabhängigen Proteinkomplexes und wurde dagegen bei ca. 232 kDa der ersten Dimension detektiert. Während die Proteinkomplexe in der ersten Dimension über eine "Blue-Native"-PAGE fraktioniert werden, erfolgt die Auftrennung der einzelnen Untereinheiten in der zweiten Dimension über eine SDS-PAGE. Dabei werden die Untereinheiten eines Komplexes in einer vertikalen Linie untereinander aufgetrennt. Die Ergebnisse der "Blue-Native"-PAGE/SDS-PAGE bestätigen somit die Co-Akkumulation der Proteine PsPIC1, PsNiCo und PsYGGT in den selben IE-Fractionen des Saccharosedichtegradienten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass PsPIC1, PsNiCo und PsYGGT Bestandteile eines Proteinkomplexes sind. Da die drei Proteine bei ca. 90 kDa der ersten Dimension detektiert wurden, können Rückschlüsse auf die Größe und die Zusammensetzung dieses Proteinkomplexes gezogen werden. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Proteingrößen für PsPIC1 (22,5 kDa), PsNiCo (33,1 kDa) und PsYGGT (15,3 kDa) ergäbe sich eine Komplexgröße von 70,9 kDa, sofern sich der Komplex aus je einem der drei Proteine zusammensetzen würde. Für *in vitro* translatiertes PIC1 konnte allerdings sowohl über eine "Blue-Native"-PAGE als auch *in vivo* in Tabak, durch das BiFC-System (bimolecular fluorescence complementation) eine Homo-Oligomerisierung nachgewiesen werden (Dissertation Daniela Duy, 2009; Dissertation Roland Stübe, 2013). Darüber hinaus interagieren PIC1-Proteine im Split-Ubiquitin-System in Hefe ebenfalls miteinander. Wenn man unter diesen Voraussetzungen von einem weiteren PIC1 und somit insgesamt zwei PIC1-Untereinheiten im Komplex ausgeht, erhielte man eine Komplexgröße von 93,4 kDa, was der Größe des aufgetrennten PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes in der ersten Dimension der "Blue-Native"-PAGE entspricht (siehe Abb. 14). Weitere Interaktionstests mit dem Split-Ubiquitin-System in Hefe über den β -Galactosidase-Assay zeigten, dass PIC1 im Hefesystem nicht direkt mit den Proteinen YGGT-B und YGGT-C interagiert (siehe Abb. 22). Frühere Ergebnisse aus Proteininteraktionstests in Hefe führten jedoch zu der Erkenntnis, dass sowohl NiCo1 als auch NiCo2 mit YGGT-B und YGGT-C interagierten (Ergebnisse nicht gezeigt).

VI.3 Die PIC1 TonB-Box ist essentiell für die PIC1-PIC1- und PIC1-NiCo-Interaktion

Sowohl die Deletion der TonB-Box von PIC1 als auch die Mutation eines Valins an Position 43 zu einem Prolin in der ersten α -Helix von PIC1, hatten einen Verlust der PIC1-Interaktion mit PIC1 und mit NiCo1 und NiCo2 im Split-Ubiquitin-System in Hefe zur Folge (Dissertation Roland Stübe, 2013). Die Mutation des Valins an Position 43 zu einem Prolin, hatte wahrscheinlich Auswirkungen auf die Sekundärstruktur des Proteins PIC1, was die Interaktion mit PIC1 und auch NiCo1 und NiCo2 beeinträchtigte. Die Seitenkette des Prolins ist kovalent an das Stickstoffatom der Aminogruppe gebunden, weshalb einerseits über die Aminogruppe keine Wasserstoffbrücken-Bindungen mehr eingegangen werden können und andererseits die Rotation der Aminogruppe beeinträchtigt ist (Kim und Kang, 1999). Prolin führt daher zur Destabilisierung α -helikaler Strukturen, wobei sich dessen Lokalisation meist auf die Termini einer α -Helix oder die "Loops" in Proteinen beschränkt (Imai und Mitaku, 2005). Neben starken Eingriffen wie der Deletion der gesamten PIC1 TonB-Box oder der Veränderung der Sekundärstruktur durch die V43P Mutation, hatte bereits die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Mutation einzelner Aminosäuren im konservierten TonB-Box-Core (siehe Abb. 40), Auswirkungen auf die Protein-Protein Interaktion von PIC1.

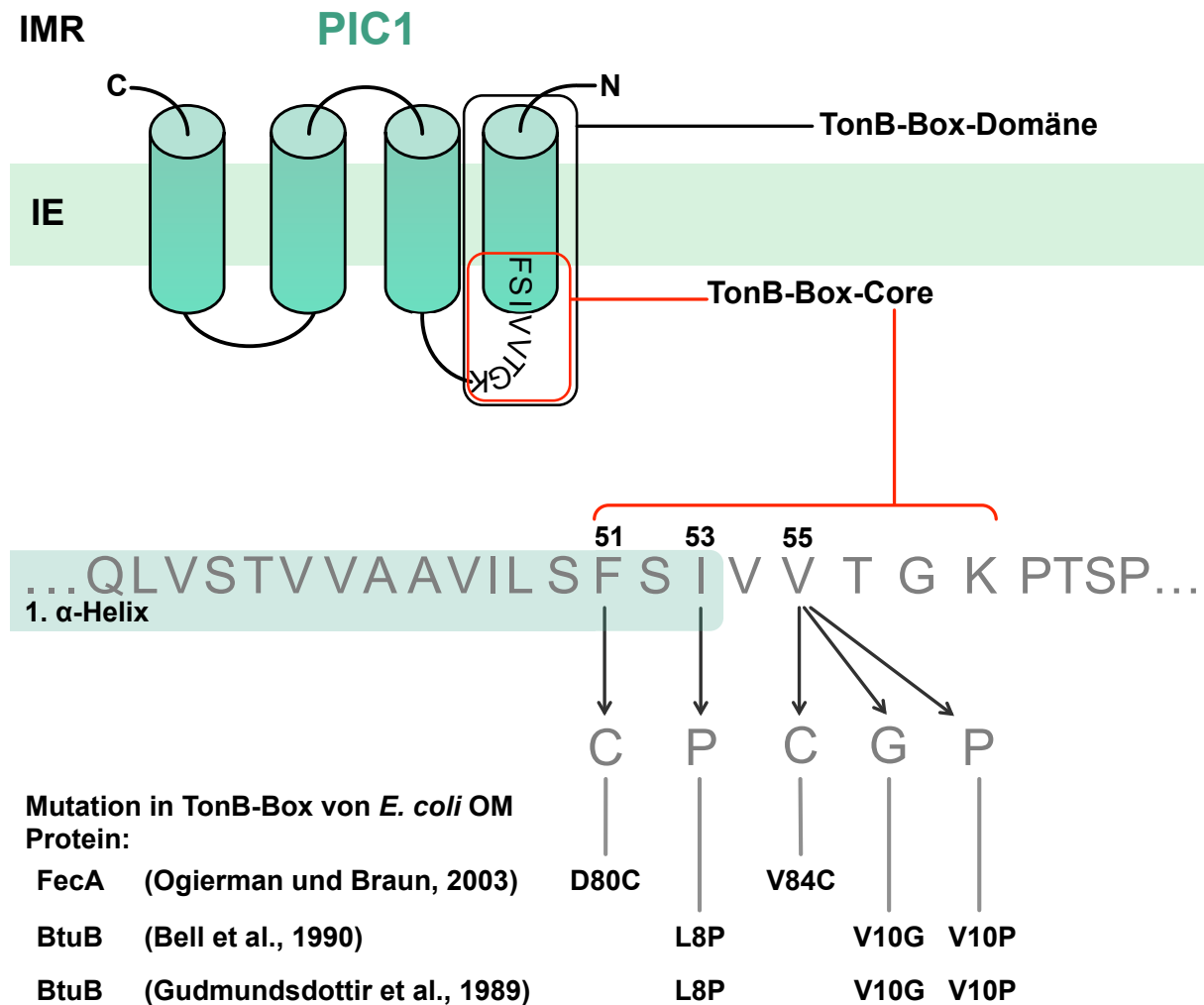


Abbildung 40: Mutationen im TonB-Box-Core.

Schematische Darstellung der TonB-Box-Domäne in PIC1 und der Mutationen im TonB-Box-Core. Die TonB-Box-Domäne (schwarzes Rechteck) erstreckt sich am N-Terminus über die erste Transmembrandomäne hinaus. Die Aminosäuren des TonB-Box-Cores (rotes Rechteck) Phenylalanin an der Position 51 (F_{51}), Isoleucin an der Position 53 (I_{53}) und Valin an der Position 55 (V_{55}) des mureinen Proteins AtPIC1, wurden zu den Aminosäuren Cystein (C), Prolin (P) oder Glycin (G) mutiert. Die Aminosäuren F_{51} und I_{53} befinden sich dabei noch in der α -Helix, während V_{55} bereits Bestandteil des Loops zwischen Helix 1 und Helix 2 ist. Die Mutationen in AtPIC1 entsprechen dabei den in der Literatur beschriebenen Mutationen in der TonB-Box der Proteine FecA und BtuB der äußeren Membran (OM = outer membrane) von *E. coli*, angedeutet mit deren jeweiligen Position.

In der Literatur beschriebene, entsprechende Mutationen der TonB-Box der Liganden-gesteuerten " β -barrel"-Rezeptor-Kanäle FecA und BtuB, Eisen-Citrat bzw. Vitamin-B₁₂ Transporter der äußeren Membran von *E. coli* (Abb. 40), hatten ausschließlich negative Effekte auf die Interaktion mit dem TonB-Protein (Gudmundsdottir et al., 1989; Bell et al., 1990; Ogierman und Braun, 2003). Die PIC1-PIC1-Interaktion, die mit nicht mutiertem PIC1 im Bait-Vektor und den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Prey-Vektor im Hefe-Split-Ubiquitin-Test getestet wurde (siehe Abb. 19), wurde hingegen durch die Mutationen F51C, I53P und V55P positiv beeinflusst. Im Gegensatz zum Prolin an Position 43 der ersten α -Helix von PIC1, befindet sich das Isoleucin an Position 53 jedoch am

C-terminalen Ende der ersten α -Helix, während das Valin an Position 55 kein Bestandteil der α -Helix mehr ist (Abb. 40). Somit kommt der Effekt des Prolins als Strukturbrecher bei den I53P und V55P Mutationen wohl nicht mehr zum Tragen. Die Mutation des Valins an Position 55 zu einem Cystein, hatte den stärksten positiven Effekt auf die PIC1-PIC1-Interaktion, was sich in einer Steigerung des Hefewachstums um den Faktor 2,4 äußerte. Zwischen den Schwefelatomen der Thiolgruppen zweier Cysteine kann es zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommen, die unter anderem eine Rolle in Protein-Protein-Interaktionen spielen. Eine Studie an ABCG2 aus Menschen, einem Mitglied der ABC-Transporter-Familie, untersuchte den Einfluss von Disulfidbrücken auf Protein-Protein-Interaktionen (Liu et al., 2008). Die Mutation der Cysteine welcher eine Beteiligung an der Dimerisierung von ABCG2 zugesprochen wird, zu Alanin, führte dabei zur Unterbindung der Dimerisierung. Das einzige endogene Cystein in PIC1 befindet sich jedoch am C-terminalen Ende der vierten α -Helix und aufgrund der Topologie von PIC1 somit auf der, dem Valin an Position 55 entgegengesetzten Seite der Membran. Die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen dem in PIC1 natürlich vorkommenden Cystein und dem zusätzlich eingefügten Cystein durch die V55C Mutation, ist daher unwahrscheinlich. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass PIC1 in Hefemembranen eine zum IE verschiedene Topologie einnimmt. Neben den Mutationen mit positiven Auswirkungen, hatte die V55G Mutation einen negativen Effekt auf die PIC1-PIC1-Interaktion, wobei das Hefewachstum um 60 % schwächer ausfiel. In der V10G Mutation der TonB-Box des *E. coli* Proteins BtuB der äußeren Membran, welche der V55G Mutation in der TonB-Box von PIC1 entspricht (Abb. 40), kam es zum kompletten Erliegen des Vitamin-B₁₂-Transportes (Gudmundsdottir et al., 1989). Als Ursache des negativen Effektes auf den Vitamin-B₁₂-Transport wird eine Störung der Sekundärstruktur von BtuB vermutet, da die TonB-Box über die Interaktion mit dem TonB-Protein im periplasmatischen Raum den Transport ermöglicht (Gudmundsdottir et al., 1989). Die Mutation des Valins zu einem Glycin erschwert die Interaktion dabei möglicherweise aus Gründen der Reichweite, da die Seitenkette des Glycins kleiner ist als die des Valins. Dies wurde bereits als Ursache für einen intramolekularen Interaktionsverlust in FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) durch eine Valin zu Glycin Mutation spekuliert (Doss et al., 2012).

Zur Verifizierung der Ergebnisse des Split-Ubiquitin-Tests, wurde die Interaktion mit den PIC1 TonB-Box-Mutanten im Bait-Vektor und dem nicht mutierten PIC1, sowie zusätzlich den Proteinen NiCo1 und NiCo2 im Prey-Vektor getestet. Zur besseren Quantifizierung der Interaktion wurde dabei auf einen β -Galactosidase-Assay zurückgegriffen (siehe Abb. 20).

Bei den Ergebnissen des β -Galactosidase-Assays zeichnete sich der Trend ab, dass die V55C und V55P Mutationen eine positive Auswirkung auf die PIC1-PIC1-Interaktion haben. Die PIC1-NiCo1-Interaktion scheint dagegen durch die V55G und die PIC1-NiCo2-Interaktion durch die V55P Mutation beeinträchtigt zu werden. Einzig signifikant war jedoch der negative Effekt der V55G Mutation auf die PIC1-PIC1-Interaktion, mit einer Reduktion der β -Galactosidase-Aktivität auf weniger als ein Drittel der β -Galactosidase-Aktivität von Hefe mit nicht mutierten PIC1-Proteinen. Die Ergebnisse entstammen allerdings der Testphase in welcher dieser Assay erst etabliert werden musste. Eine Normierung der Messwerte über die Quantifizierung der Prey-Konstrukt-Expression war zudem nicht möglich, da die Immunodetektion der Prey-Proteine zu schwach und die Hintergrundsignale zu stark waren (siehe Abb. 6). Nach der Verbesserung der Immunodetektion und einer Verringerung der Hintergrundsignale, wird eine Wiederholung des β -Galactosidase-Assays daher zu belastbareren Ergebnisse führen.

Die entsprechenden TonB-Box-Core Mutationen in *E. coli* hatten ausschließlich negative Effekte auf die Funktion der TonB-Box, wobei diese in den Proteinen FecA und BtuB direkt für den Transport ausschlaggebend ist. Im Eisen-Citrat-Transporter FecA aus *E. coli* ermöglicht die Interaktion der TonB-Box mit dem TonB-Protein die Öffnung des "β-barrel"-Kanals von FecA und somit den Transport des Eisen-Citrats (Nikaido, 2003). Im PIC1-NiCo-YGGT-Komplex scheint die PIC1 TonB-Box für die Interaktion von Untereinheiten (PIC1-PIC1 und PIC1-NiCo1/2) und damit für die Komplexbildung selbst essentiell zu sein. Bereits der Austausch einzelner Aminosäuren im konservierten Bereich der PIC1 TonB-Box beeinflusst die Protein-Protein-Interaktion stark. Das Valin an Position 55 der ersten α -Helix von PIC1 spielt dabei eine zentrale Rolle für die PIC1-PIC1- und PIC1-NiCo1/2-Interaktion. Jedoch ist die PIC1 TonB-Box möglicherweise nicht nur für die Protein-Protein-Interaktion essentiell, sondern übernimmt eventuell auch eine direkte Funktion in der Ermöglichung des Transports von Eisen.

VI.4 PIC1, NiCo1/2 und YGGT-C sind essentiell für die pflanzliche Eisenhomöostase

Für die Verlustmutanten *pic1* und *nico1/2* wurden bereits klassische Eisenmangel-Symptome wie Chlorosen beschrieben (Duy et al., 2007; Dissertation Roland Stübe, 2013). Dieser Phänotyp konnte nun auch für die T-DNA-Insertionslinie *yggc* ("knock down") gezeigt werden (siehe Abb. 23), die Chlorosen an jungen Blättern aufwies. Die untersuchten, induzierbaren *PIC1*- *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Mutanten zeigten nach Induktion des RNAi ebenfalls einen klassischen Eisenmangel-Phänotyp. In allen RNAi-Linien war der

jeweilige Transkriptgehalt nach Induktion dabei stark herabreguliert (siehe Abb. 26, 27 und 28) was zeigt, dass es sich tatsächlich bei allen Linien um "knock down"-Mutanten handelt. Da zudem je mindestens zwei unabhängige Linien der RNAi-Mutanten den gleichen Phänotyp aufwiesen, ist der Phänotyp auch sicher auf den "knock down" des jeweiligen Transkripts zurückzuführen. Bei Induktion des RNAi im Sämlingsstadium waren die Pflanzen der *PIC1*- und der *NiCo1/2*-RNAi-Linien chlorotisch, wobei die Chlorosen in den Kotyledonen stärker ausgeprägt und die Kotyledonen der *NiCo1/2*-RNAi-Linien zusätzlich deformiert waren (siehe Abb. 29). Außerdem kam es zu einer Störung der Mesophyllorganisation (siehe Abb. 31), wobei eine Zuordnung der Zellen zu Palisadenparenchym oder Schwammparenchym kaum noch möglich war. Dieser Phänotyp entspricht dabei jenem, der bereits für die Verlustmutante *pic1* beschrieben wurde (Duy et al., 2007). Der Phänotyp der RNAi-linie *pic1* 9.9 war allerdings nicht in allen Zellen ausgeprägt. Neben Zellen mit geschädigten Chloroplasten, befanden sich Zelle die intakte Chloroplasten enthielten (siehe Abb. 31 und 36). Das Ausbleiben des Eisenmangel-Phänotyps wurde dabei möglicherweise durch ein "Silencing" des 35S-Promotors im RNAi-Konstrukt verursacht. Dies könnte dazu geführt haben, dass das RNAi-Konstrukt in manchen Zellen nicht exprimiert wurde und dort somit keinen "knock down" von *PIC1* verursachen konnte. Bei den *YGGT-C*-RNAi-Linien konzentrierten sich die Chlorosen auf die sich gerade entwickelnden, ersten Rosettenblätter (siehe Abb. 30), entsprachen jedoch in der Stärke der Ausprägung dem Phänotyp der *PIC1*- und *NiCo1/2*-RNAi-Linien. Je nach Stärke des "knock down" eines Gens bleibt jedoch immer eine Transkript-Restmenge vorhanden, die zu einem mehr oder minder stark ausgeprägten Phänotyp führt. So sind die Chlorosen in den *YGGT-C*-RNAi-Linien schwächer ausgeprägt als in den *PIC1*- und *NiCo1/2*-RNAi-Linien, während *YGGT-C*-Verlustmutanten dagegen embryoletal sind (Tzafrir et al., 2004; Kabeya et al., 2010). Die Analyse der Ultrastruktur der Kotyledonen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie zeigte, dass das Thylakoidmembransystem der induzierten *PIC1*- und *NiCo1/2*-RNAi-Linien stark geschädigt war (siehe Abb. 32). Dabei blieb unklar, ob die Thylakoide in der Zersetzung begriffen waren, oder gar nicht erst, beziehungsweise nicht korrekt gebildet wurden. Für Os-ZN (zebra-necrosis), einen NiCo Vertreter in Reis, wurde bereits eine essentielle Funktion in der Chloroplastenentwicklung, insbesondere während der Bildung von Proteinkomplexen der Thylakoide, beschrieben (Li et al., 2010). Interessanterweise waren neben den Thylakoiden außerdem die Chloroplastenhüllmembranen der *NiCo1/2*-RNAi-Linien extrem geschädigt und fehlten teilweise komplett (siehe Abb. 32). Die NiCo Proteine besitzen eine HX₅DH-Domäne, wobei

für diese Domäne in verwandten Proteinen aus Bakterien eine Funktion in der Metallbindung und des Metalltransportes nachgewiesen wurde (Eitinger et al., 2005). In Pflanzen könnten die NiCo Proteine somit die Funktion der Bindung von Eisen übernehmen. Fehlen allerdings sowohl NiCo1 als auch NiCo2, könnte das für den Transport bestimmte Eisen nicht gebunden werden. Eine Akkumulation des Eisens im Intermembranraum der Chloroplasten würde durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies die Membranen beschädigen, was dem Phänotyp der *NiCo1/2*-RNAi-Linien entspräche. So wurde gezeigt, dass es in chlorotischen Blattbereichen der *zn*-Mutante (zebra-necrosis) in Reis zu einer lichtabhängigen Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies kam (Li et al., 2010).

Im Rosettenblattstadium zeigten nach Induktion des RNAi alle *PIC1*-, *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien ähnliche Chlorosen an jungen Blättern und der Blattbasis noch nicht ausgewachsener Blätter. Dabei wiesen auch in diesem Stadium die jungen Blätter der *NiCo1/2*-RNAi-Linien leichte Deformationen auf (siehe Abb. 35). Da die älteren Blätter jedoch keinerlei Chlorosen zeigten, führt ein plötzlicher Mangel von *PIC1*, *NiCo1* und *NiCo2* sowie *YGGT-C* vermutlich nicht zum Abbau bereits existierender Thylakoide, sondern zu einer Beeinträchtigung der Bildung des Thylakoidmembransystems. Zwar waren die Thylakoide bei allen induzierten Linien geschädigt und in Auflösung begriffen (siehe Abb. 38 und 39), doch waren die Effekte generell weniger stark ausgeprägt als im Sämlingsstadium. So waren auch die Hüllmembranen der Chloroplasten in den *NiCo1/2*-RNAi-Linien noch vorhanden. Die RNAi-Induktion erfolgte allerdings nur kurzzeitig und darüber hinaus in einem Stadium, in dem es der Pflanze zumindest in älteren Pflanzenteilen bereits möglich war, Eisen aufzunehmen und eventuell Reserven anzulegen. Dadurch könnte ein plötzlich auftretender Eisenmangel besser ausgeglichen werden als bei einer RNAi-Induktion von der Keimung an. Auch die Mesophyllorganisation war wie schon bei den *PIC1*- und *NiCo1/2*-RNAi-Linien im Sämlingsstadium beschrieben, bei allen untersuchten *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien gestört (siehe Abb. 37). Zudem enthielten Zellen der induzierten Linien weniger Chloroplasten, welche zusätzlich bei der *YGGT-C*-RNAi-Linie kleiner waren. Eine Korrelation zwischen dem Protein *YGGT-C* und der Chloroplastengröße wurde bereits beschrieben (Kabeya et al., 2010). In *YGGT-C*-Überexprimierern in *Arabidopsis* befanden sich weniger Chloroplasten pro Zelle, die allerdings größer waren als Chloroplasten der Kontrollpflanzen. Dies wurde auf eine Beteiligung von *YGGT-C* an der Chloroplastenteilung zurückgeführt. Während *YGGT-C*-Verlustmutanten embryonal waren, zeigten "knock down"-Mutanten Chlorosen in jungen Blattbereichen, von denen sich die Blätter mit zunehmendem Alter erholten. Die

Chloroplasten in chlorotischen Blattbereichen wiesen dabei eine verringerte Größe auf. Ein Effekt der Mutation auf die Chloroplastenteilung konnte jedoch nicht festgestellt werden (Kabeya et al., 2010). Dieser Phänotyp entspricht somit dem, in dieser Arbeit beschriebenen, Phänotyp der *YGGT-C* "knock down"-Mutanten (siehe Abb. 23 und 37), wobei bei diesen zusätzlich Schäden an den Thylakoiden auftraten.

Die Proteine PIC1, NiCo1 zusammen mit NiCo2 und YGGT-C spielen jeweils eine essentielle Rolle in der Eisenhomöostase, da der "knock down" der jeweiligen Gene einen Eisenmangel-Phänotyp hervorruft. Da die jeweiligen Phänotypen ähnlich waren, ist zudem davon auszugehen, dass diese Proteine alle eine Funktion in der Bewältigung der gleichen Aufgabe übernehmen.

VI.5 PIC1 und TIC20 interagieren nicht miteinander und bilden keinen Komplex

PIC1 wurde in der Literatur ebenfalls als TIC21, eine essentielle Komponente eines putativen Proteintranslocons des IE beschrieben, wobei die Verlustmutante *tic21* scheinbar Defekte im Transport von Proteinen über den IE aufwies (Teng et al., 2006). Dagegen wurde bereits gezeigt, dass sich in der gleichen T-DNA-Insertionslinie ("*pic1*") das Protein Ferritin in Chloroplasten befindet. Somit konnten sehr wohl erfolgreich Proteine in Chloroplasten der *pic1*-Mutante importiert werden (Duy et al., 2007). Zusätzlich wurde spekuliert, dass sowohl TIC21 als auch TIC20 an der Chloroplasten-Biogenese beteiligt sind und miteinander interagieren (Teng et al., 2006). Unterstützung erfuhr diese Hypothese durch die Identifikation eines 1-MDa großen Proteinimportkomplexes des IE, welcher neben TIC20 ebenfalls TIC21 enthalten sollte (Kikuchi et al., 2009). Weitere Versuche der gleichen Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass sich PIC1/TIC21 nicht zusammen mit dem 1-MDa-Komplex aufreinigen lässt (Kikuchi et al., 2013), was der Beteiligung von PIC1/TIC21 an jenem Komplex widerspricht. Um diese Hypothese weiter zu testen, wurde das Protein TIC20 daher in Split-Ubiquitin-Tests in Hefe auf eine Interaktion mit PIC1 hin untersucht. Außerdem wurde eine Komplexbildung von PIC1 mit TIC20 über die Dichtegradientenzentrifugation und auch die "Blue-Native"-PAGE/SDS-PAGE getestet. Die Interaktionsstudien über den Split-Ubiquitin-Test mittels des β -Galactosidase-Assays zeigten jedoch, dass es im Hefe-System zu keiner Interaktion zwischen PIC1 und TIC20 kommt (siehe Abb. 22). Auch deckten sich die Akkumulationsmaxima von PIC1 und TIC20 in den Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation nicht, wie es für Proteine eines Komplexes der Fall wäre (siehe Abb. 12 und 13). In der zweiten Dimension der "Blue-Native"-PAGE kam es darüber hinaus nicht zu einer Co-Migration von TIC20 mit PIC1 bei ca. 90 kDa der ersten

Dimension (Abb. 14). Bei der Entdeckung des 1 MDa-Komplexes wurde tatsächlich gezeigt, dass PIC1 in der zweiten Dimension einer "Blue-Native"-PAGE hauptsächlich im Bereich zwischen 66 und 132 kDa der ersten Dimension detektiert wurde (Kikuchi et al., 2009). Dieser Bereich deckt sich mit der Co-Migration der Proteine PIC1, NiCo und YGGT bei ca. 90 kDa der ersten Dimension der "Blue-Native"-PAGE in dieser Arbeit. Geringe Anteile an PIC1, die in höheren kDa-Bereichen der ersten Dimension detektiert wurden (Kikuchi et al., 2009), gehen eventuell auf eine zu milde Solubilisierung der Proben zurück, die mit 1 % Digitonin erfolgte. Für die Solubilisierung der Proben der "Blue-Native"-PAGE in dieser Arbeit wurde dagegen 1 % Dodecyl- β -D-Maltosid verwendet. TIC20 wurde in dieser Arbeit zudem bei über 669 kDa der ersten Dimension der "Blue-Native"-PAGE detektiert (siehe Abb. 14), was tatsächlich für eine Beteiligung an einem 1 MDa-Komplex spricht. PIC1 ist jedoch kein Bestandteil dieses Komplexes und sowohl eine Assemblierung von PIC1 zusammen mit TIC20 in einem Komplex, als auch eine Interaktion zwischen beiden Proteinen kann ausgeschlossen werden.

VI.6 Das PIC1-NiCo-YGGT-Metalltranslocon

Durch native Fraktionierung der Proteinkomplexe der inneren Hüllmembran von Chloroplasten und Protein-Protein-Interaktionstests mit dem Split-Ubiquitin-System in Hefe, konnte durch zwei völlig verschiedene Methoden die Existenz eines PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes bewiesen werden. Die Split-Ubiquitin-Tests zeigten außerdem, dass die PIC1 TonB-Box für die PIC1-PIC1- und PIC1-NiCo1/2-Interaktion eine zentrale Rolle spielt. Die induzierten *PIC1*- *NiCo1/2*- und *YGGT-C*-RNAi-Linien wiesen zudem einen Eisenmangel-Phänotyp auf, der in allen untersuchten Linien vergleichbar ausgeprägt war. Die Ergebnisse unterstützen daher das Modell des PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes, welcher durch den Transport von Eisen über den IE eine essentielle Rolle in der pflanzlichen Eisenhomöostase spielt. Unterstützung erfährt dieses Modell durch Parallelen zu Nickel/Cobalt-ABC-Transportern der CbiMNQO/NikMNQO-Familie in Bakterien (Abb. 41).

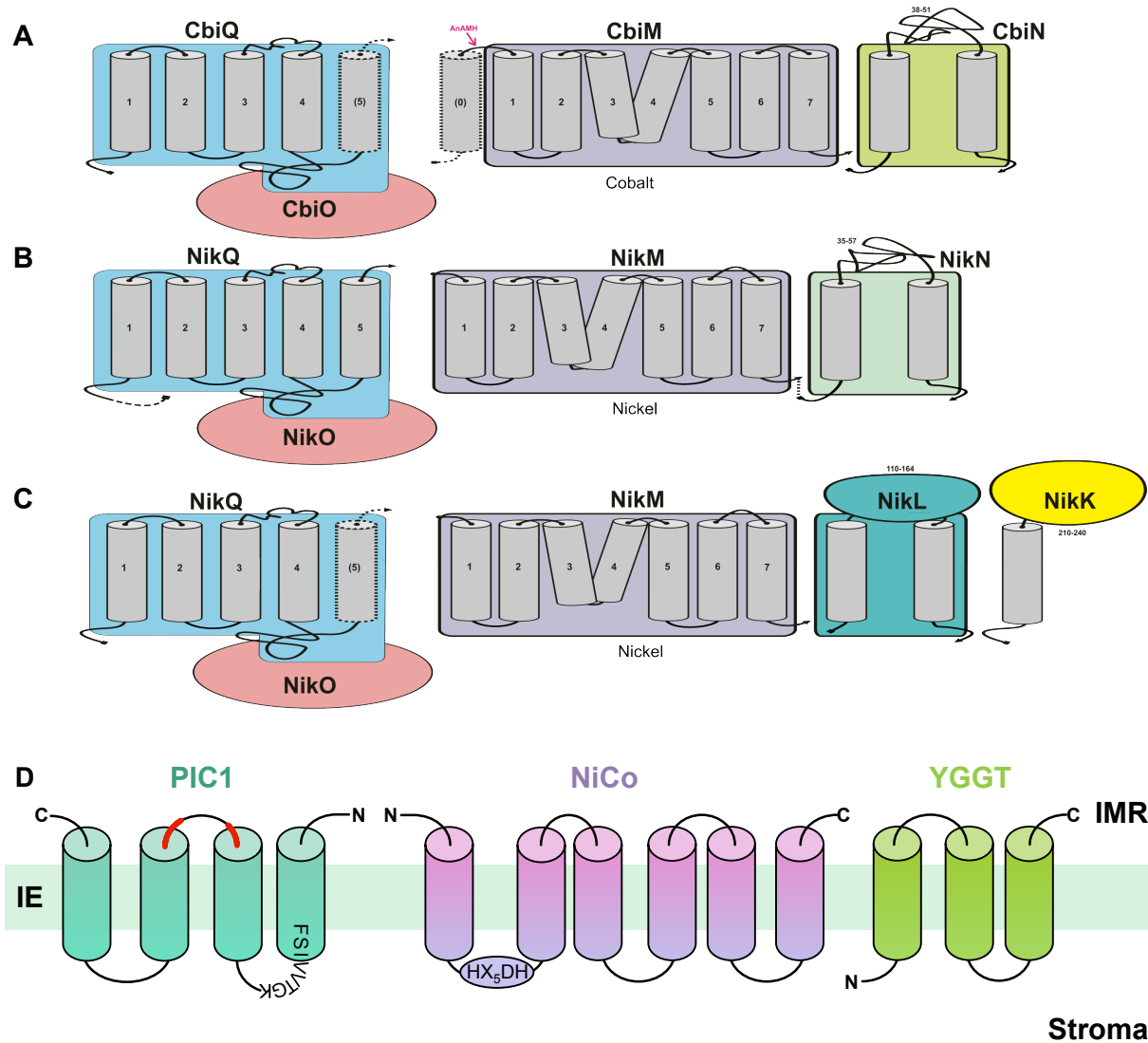


Abbildung 41: Topologische Modelle des PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes und der CbiMNQO/NikMNQO-Transporter

(A) Cobalt-Transporter CbiMNQO verschiedener Bakterien und Archaeen. (B) Nickel-Transporter NikMNQO verschiedener Bakterien und Archaeen. (C) Nickel-Transporter NikMLKQO verschiedener Proteobakterien und Cyanobakterien. (D) PIC1-NiCo-YGGT-Komplex. Transmembrandomänen sind als Zylinder und nicht konservierte Transmembrandomänen sind mit gestrichelter Linie dargestellt. Zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne von PIC1 befinden sich zwei α -Helices (rote Linien). FSIIVTGK: Aminosäuren des PIC1 TonB-Box-Cores, HX₅DH: konserviertes Histidin-Motiv des Proteins NiCo, IE: innere Chloroplastenhüllmembran, IMR: Intermembranraum, C: C-Terminus, N: N-Terminus, für YGGT ist die Orientierung und Membran-Topologie nicht experimentell bestätigt. Modelle der CbiMNQO/NikMNQO-Transporter modifiziert nach Rodionov et al. (2006).

Diese Transporter bestehen aus den drei transmembranen Untereinheiten CbiQ/NikQ, CbiM/NikM und CbiN/NikN sowie der löslichen ATPase-Untereinheit CbiO/NikO (Rodionov et al., 2006). Die Untereinheit CbiQ/NikQ besitzt vier bis fünf Transmembrandomänen, wobei eine optionale fünfte Transmembrandomäne nicht konserviert ist (Abb. 41A). Die Untereinheit CbiQ/NikQ könnte dabei dem Protein PIC1 mit seinen vier Transmembrandomänen entsprechen. Zusätzlich besitzt CbiQ/NikQ Bindestellen für die

ATPase CbiO/NikO. PIC1 besitzt dabei ebenfalls zwei lösliche α -Helices zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (Abb. 41), mit einer möglichen Bindefunktion von ATPase-Untereinheiten (Dissertation Daniela Duy, 2009). Die Untereinheit CbiM/NikM hat sieben Transmembrandomänen und besitzt einen stark konservierten Bereich in dem sich zwei Histidin und mehrere negativ geladene Aminosäuren befinden, wobei eine Beteiligung dieses Bereichs an der Metallerkennung spekuliert wird (Rodionov et al., 2006). Die Proteine NiCo1 und NiCo2 besitzen mit ihrer HX₅DH-Domäne ebenfalls ein konserviertes Histidin-Motiv, aufgrund dessen sie in die Familie der NiCoT-Transporterfamilie eingruppiert wurden (Eitinger et al., 2005). In Bakterien spielt dieses konservierte Histidin-Motiv, die HX₄DH-Domäne, eine zentrale Rolle in der Affinität, Selektivität und Transportgeschwindigkeit des Metalltransportes. In pflanzlichen NiCo-Transportern wird die HX₅DH-Domäne als Bestandteil der zweiten von sieben Transmembrandomänen beschrieben (Eitinger et al., 2005). Untersuchungen zur Topologie des NiCo-Proteins aus Erbsenchloroplasten zeigten allerdings eine Orientierung des N- sowie des C-Terminus in den Intermembranraum der Chloroplastenhüllen und bestätigten ein NiCo-Modell mit sechs Transmembrandomänen (Dissertation Roland Stübe, 2013). Der Proteinabschnitt der Proteine NiCo1 und NiCo2 der die HX₅DH-Domäne beinhaltet, stellt somit keine Transmembrandomäne dar, kann aber sicherlich in den Membranbereich eingefaltet sein. In ihrer Funktionsweise könnten die pflanzlichen NiCo Proteine daher CbiM/NikM entsprechen. Die Untereinheit CbiN/NikN ist essentiell für Metall-Transportfunktion der CbiMNQO/NikMNQO-Transporter, da dessen Deletion den Metalltransport inaktiviert (Rodionov et al., 2006). Die genaue Funktion der Untereinheit CbiN/NikN ist unbekannt, jedoch wird eine Beteiligung an der Beladung von CbiM/NikM mit Metallen oder aber auch der Entlassung der Metalle durch CbiM/NikM diskutiert (Kirsch und Eitinger, 2014; Yu et al., 2014). In einigen NikMNQO-Transportern ist NikN gar kovalent an NikM gebunden (Kirsch und Eitinger, 2014). Die Untereinheit CbiN/NikN könnte daher das Pendant zu YGGT darstellen. Während es zwischen PIC1 und YGGT-B sowie YGGT-C im Split-Ubiquitin-Test zu keiner Interaktion kam (siehe Abb. 22), interagieren NiCo1 und NiCo2 jeweils mit YGGT-B und YGGT-C in diesem System (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies deutet eine stärkere Wechselwirkung zwischen NiCo und YGGT an, wie sie auch zwischen den Untereinheiten CbiM/NikM und CbiN/NikN besteht. Im Gegensatz zu den drei vorhergesagten Transmembrandomänen von YGGT-B und YGGT-C, besitzt CbiN/NikN zwei Transmembrandomänen. Statt der Untereinheit CbiN/NikN besitzen Vertreter der NikMNQO-Transporter in Proteobakterien und Cyanobakterien (Abb. 41C) allerdings eine

NikL-Untereinheit und nahezu alle dieser Transporter besitzen zusätzlich eine NikK-Untereinheit (Rodionov et al., 2006). Die Untereinheit NikK besitzt eine Transmembrandomäne und könnte wie CbiN/NikN und NikL an der Bindung von Nickel beteiligt sein (Rodionov et al., 2006). Die Proteine YGGT-B und YGGT-C weisen somit Ähnlichkeiten zu den zwei Transmembrandomänen von NikL zusammen mit der Transmembrandomäne von NikK auf. Jedoch ist die Topologie der YGGT-Proteine noch nicht experimentell bestimmt, sondern beruht bisher auf Vorhersagen, weshalb YGGT-B und YGGT-C jeweils auch nur zwei Transmembrandomänen besitzen könnten. Im PIC1-NiCo-YGGT-Komplex könnte YGGT eine eventuelle Erkennung und Bindung von Eisen durch NiCo unterstützen. Durch die Interaktion von NiCo mit PIC1, vermittelt durch die PIC1 TonB-Box, könnte daraus im Anschluss möglicherweise eine Aktivierung des Eisentransportes durch die Permease PIC1 resultieren. In diesem Fall würde die TonB-Box eine direkte Funktion im Transport von Eisen übernehmen, wie es beim Eisen-Citrat-Transporter FecA in der äußeren Membran von *E. coli*, der Fall ist. FecA formt einen "β-barrel"-Rezeptor-Kanal, wobei der N-terminale, globuläre Teil, der zudem eine TonB-Box enthält, in den Kanal inseriert und ihn auf diese Weise verschließt (Nikaido, 2003). Sobald der Ligand Eisen-Citrat mit hoher Affinität an den Rezeptorbereich von FecA bindet, kommt es im N-terminalen Teil zu Konformationsänderungen. Dadurch wird eine Interaktion der TonB-Box mit einem TonB-Protein ermöglicht, was eine weitere Konformationsänderung zur Folge hat. Aufgrund dieser Konformationsänderung öffnet der N-terminale, globuläre Teil von FecA den Kanal und ermöglicht dadurch einen Eisen-Citrat-Transport, wobei für diesen Vorgang Energie aufgewandt werden muss (Nikaido, 2003). Im PIC1-NiCo-YGGT-Komplex könnten die beiden löslichen α -Helices von PIC1 als Bindestelle für ATPasen fungieren und somit die Energieübertragung für einen aktiven Transport von Eisen ermöglichen.

VI.7 Ausblick

Während die transiente Expression von *AtNiCoI-GFP* in Tabak zunächst nicht gelang, wurde sie durch Co-Transformation mit dem Helferplasmid p19 verbessert (siehe Abb. 10). Die Verbesserung der transienten Expression ist auf die Fähigkeit des Helferplasids, das posttranskriptionelle Gen-"Silencing" zu unterbinden, zurückzuführen (Voinnet et al., 2003). Mit dem p19-Helferplasmid ist daher eventuell auch eine reibungslose Umsetzung eines Interaktionsnachweises von PIC1 mit NiCo1, NiCo2 und YGGT-C in Tabak über das BiFC-System möglich.

Das Hydrokultur-System wurde etabliert und bereits erfolgreich für die Anzucht und Induktion der RNAi-Linien benutzt (siehe Abb. 34). Dieses System ermöglicht das exakte Verabreichen von Substanzen und auch die Aufrechterhaltung von deren Konzentration über sehr lange Zeiträume hinweg. Somit sind zukünftige, physiologische Experimente wie die Auswirkungen von Eisenmangel oder Eisenüberschuss auf die zu untersuchenden *Arabidopsis*-Linien, nun gut durchführbar und auch deren Phänotypisierung unter nicht-Standard-Bedingungen ist bestens kontrollierbar möglich.

Die Überproduktion maturer Membranproteine in voller Länge gestaltet sich in *E. coli* teilweise als schwierig. So konnte nur ein C-terminales Fragment des Proteins PsNiCo in *E. coli* überproduziert und für die Antikörpergewinnung eingesetzt werden (Dissertation Roland Stübe, 2013). Die Überproduktion des ABC-Transporters der inneren Mitochondrienmembran ATM3 (ABC transporters of mitochondria 3) gelang jedoch im *Lactococcus lactis* Stamm NZ9000 $\Delta lmrA \Delta lmrCD$ (Schädler et al., 2014). Daher eignet sich dieses System womöglich auch für die Proteine PIC1, NiCo und YGGT, für welche bereits Parallelen zum bakterielle ABC-Transporter CbiMNQO/NikMNQO erwähnt wurden. Zudem zeichnet sich das *Lactococcus*-System durch eine gute Regulierbarkeit der Protein-Überproduktion über einen Nisin-induzierbaren Promotor, eine geringe proteolytische Aktivität und selten auftretende Fehlfaltung der Proteine aus (Kunji et al., 2003; Schädler et al., 2014). Das *Lactococcus*-System ist bereits vorhanden und muss lediglich etabliert werden. Durch eine erfolgreiche Überproduktion der Proteine PIC1, NiCo und YGGT könnten neue Antikörper produziert werden, die sich spezifisch gegen die volle Länge der Proteine richten. Ein Bestandteil des bakteriellen ABC-Transporters CbiMNQO ist die lösliche ATPase-Untereinheit CbiO (Rodionov et al., 2006). Eine mögliche ATPase-Untereinheit des PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes ist jedoch nach wie vor unbekannt. Neue, spezifische Antikörper könnten daher auf der Suche nach einer solchen Untereinheit mittels Co-Immunopräzipitation, sehr nützlich sein. Auch die Co-Immunopräzipitation der einzelnen Proteine des PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes durch, gegen einzelne Untereinheiten gerichtete Antikörper, würde dadurch ermöglicht. Für die Analyse der hypothetischen Topologie der YGGT-Proteine, wären spezifisch gegen die volle Länge des Proteins gerichtete Antikörper wichtig. Die Expression von Membranprotein-codierenden Genen im *Lactococcus*-System erlaubt zudem die Isolation von Membranvesikel die das überproduzierte Protein enthalten. In Experimenten zu ATM3 (ABC transporters of mitochondria 3) aus *Arabidopsis*, einem ABC-Transporter der an der Bildung cytosolischer Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt ist, wurde der Transport von Glutathion-Polysulfiden durch

ATM3 nachgewiesen (Schädler et al., 2014). Der Transportnachweis erfolgte dabei über die Akkumulation der Substrate (GSSG und GS-S-SG) in Membranvesikel, die ATM3 enthielten und aus *Lactococcus lactis* isoliert wurden. Die Produktion der Proteine des PIC1-NiCo-YGGT-Komplexes im Lactococcus-System würde somit funktionelle Analysen ermöglichen. Der direkte Nachweis einer Protein-Interaktion mit der PIC1 TonB-Box hingegen, könnte über das Biacore-SPR-System (surface plasmon resonance; GE Healthcare) getestet werden.

Weitere funktionelle Studien wären mit dem *E. coli* Stamm H1771 möglich. Dieser Stamm weist Defekte in seinen Eisentransport-Systemen auf, was erniedrigte, interne Eisenkonzentrationen zur Folge hat (Hantke, 1987; Kammler et al., 1993). Zudem trägt dieser Stamm eine chromosomale Fusion des Fur-regulierten *fhuF*-Promotors mit dem *lacZ*-Gen, welches die relative Messung der inneren Eisenkonzentration über β -Galactosidase-Aktivität ermöglicht (Marlovits et al., 2002). Kommt es durch Komplementation des Eisentransport-Defektes zu erhöhten inneren Eisenkonzentrationen, bildet das Eisen mit dem Fur-Protein einen Komplex, wodurch die Expression des *lacZ*-Reportergens inhibiert wird (Weaver et al., 2013). Die normalerweise blauen Kolonien auf X-Gal-Agarmedium sind daher bei einer erfolgreichen Komplementation weiß. Über eine eventuelle Komplementation des Eisenaufnahmedefektes durch PIC1, NiCo, YGGT oder einer Kombination der Proteine, könnte ein direkter funktioneller Nachweis des Komplexes dieser Proteine im Eisentransport erbracht werden. Der *E. coli* Stamm H1771 sowie die benötigten Vektoren sind bereits vorhanden und wurden durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüft.

VII Literatur

- Alscher, R. G., Erturk, N. und Heath, L. S.** (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, **53**(372), 1331–1341.
- Aoki, Y., Okamura, Y., Tadaka, S., Kinoshita, K. und Obayashi, T.** (2016). ATTED-II in 2016: A plant coexpression database towards lineage-specific coexpression. *Plant and Cell Physiology*, **57**(1), e5.
- Van Bambeke, F., Balzi, E. und Tulkens, P. M.** (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, **60**(4), 457–470.
- Bashir, K., Ishimaru, Y., Shimo, H., Nagasaka, S., Fujimoto, M., Takanashi, H., Tsutsumi, N., An, G., Nakanishi, H. und Nishizawa, N. K.** (2011). The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nature communications*, **2**(May), 322. Nature Publishing Group.
- Bechthold, N., Ellis, J. und Pelletier, G.** (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C.R.Acad.Sci.Paris/Life sciences*, **316**, 1194–1199.
- Bell, P. E., Nau, C. D., Brown, J. T., Konisky, J. und Kadner, R. J.** (1990). Genetic suppression demonstrates interaction of TonB protein with outer membrane transport proteins in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **172**(7), 3826–3829.
- Briat, J. F., Duc, C., Ravet, K. und Gaymard, F.** (2009). Ferritins and iron storage in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V.
- Brüggemann, W., Maas-Kantel, K. und Moog, P. R.** (1993). Iron uptake by leaf mesophyll cells: The role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta*, **190**(2), 151–155.
- Brumbarova, T., Bauer, P. und Ivanov, R.** (2015). Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd.
- Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. und Deisenhofer, J.** (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from Escherichia coli. *Nature Structural Biology*, **6**(1), 56–63.
- Bughio, N., Takahashi, M., Yoshimura, E., Nishizawa, N.-K. und Mori, S.** (1997). Light-Dependent Iron Transport into Isolated Barley Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **38**(1), 101–105.
- Chu, H., Chiecko, J., Punshon, T., Lanzirrotti, A., Lahner, B., Salt, D. E. und Walker, E. L.** (2010). Successful reproduction requires the function of Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures. *Plant physiology*, **154**(1), 197–210.
- Colangelo, E. P. und Guerinot, M. Lou.** (2004). The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response. *The Plant Cell*, **16**(12), 3400–3412.
- Conte, S. S., Chu, H. H., Rodriguez, D. C., Punshon, T., Vasques, K. a, Salt, D. E. und Walker, E. L.** (2013). Arabidopsis thaliana Yellow Stripe1-Like4 and Yellow Stripe1-Like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis. *Frontiers in plant science*, **4**(July), 283.

- Conte, S. S. und Lloyd, A. M.** (2010). The MAR1 transporter is an opportunistic entry point for antibiotics. *Plant signaling & behavior*, **5**(1), 49–52.
- Conte, S. S. und Walker, E. L.** (2011). Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant*, **4**(3), 464–476
- Conte, S., Stevenson, D., Furner, I. und Lloyd, A.** (2009). Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant physiology*, **151**(2), 559–573.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P. und Mari, S.** (2009). Metal movement within the plant: Contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*, **103**(1), 1–11
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F. und Walker, E. L.** (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, **409**(6818), 346–349.
- DiDonato, R. J., Roberts, L. A., Sanderson, T., Eisley, R. B. und Walker, E. L.** (2004). *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): A metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant Journal*, **39**(3), 403–414.
- Divol, F., Couch, D., Conejero, G., Roschztardt, H., Mari, S. und Curie, C.** (2013). The *Arabidopsis* YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *Plant Cell*, **25**(3), 1040–1055.
- Doss, C. G. P., Rajith, B., Garwasis, N., Mathew, P. R., Raju, A. S., Apoorva, K., William, D., Sadhana, N. R., Himani, T. und Dike, I. P.** (2012). Screening of mutations affecting protein stability and dynamics of FGFR1-A simulation analysis. *Applied and Translational Genomics*, **1**, 37–43.
- Durrett, T. P., Gassmann, W. und Rogers, E. E.** (2007). The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant physiology*, **144**(1), 197–205.
- Duy, D.** (2009). *PIC1, eine Eisen-Permease in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten*. LMU München.
- Duy, D., Stübe, R., Wanner, G. und Philippar, K.** (2011). The chloroplast permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron. *Plant physiology*, **155**(4), 1709–22.
- Duy, D., Wanner, G., Meda, A. R., von Wiren, N., Soll, J. und Philippar, K.** (2007). PIC1, an Ancient Permease in *Arabidopsis* Chloroplasts, Mediates Iron Transport. *the Plant Cell Online*, **19**(3), 986–1006.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. und Guerinot, M. L.** (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(11), 5624–5628.
- Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L. und Smith, J. A. C.** (2005). Secondary transporters for nickel and cobalt ions: Theme and variations. *BioMetals*, **18**(4) 399–405.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und Heijne, G. Von.** (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, **8**(5), 978–984.

- Ferro, M., Brugière, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C. und Rolland, N.** (2010). AT_CHLORO, a Comprehensive Chloroplast Proteome Database with Subplastidial Localization and Curated Information on Envelope Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, **9**(6), 1063–1084.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Reyt, G., Gaymard, F., Abadía, A., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A. und Briat, J. F.** (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytologist*, **201**(1), 155–167.
- Franssen, S. U., Shrestha, R. P., Bräutigam, A., Bornberg-Bauer, E. und Weber, A. P. M.** (2011). Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing. *BMC genomics*, **12**(1), 227.
- García, M. J., Lucena, C., Romera, F. J., Alcántara, E. und Pérez-Vicente, R.** (2010). Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **61**(14), 3885–3899.
- Gendre, D., Czernic, P., Conéjéro, G., Pianelli, K., Briat, J. F., Lebrun, M. und Mari, S.** (2007). TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *Plant Journal*, **49**(1), 1–15.
- Gong, X., Guo, C., Terachi, T., Cai, H. und Yu, D.** (2015). Tobacco PIC1 Mediates Iron Transport and Regulates Chloroplast Development. *Plant Molecular Biology Reporter*, **33**(3), 401–413.
- Gould, S. B., Waller, R. F. und Mcfadden, G. I.** (2008). Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology*, **59**(February), 491–517.
- Green, L. S. und Rogers, E. E.** (2004). FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis. *Plant physiology*, **136**, 2523–2531.
- Gudmundsdottir, A., Bell, P. E., Lundrigan, M. D. und Bradbeer, C.** (1989). Point mutations in a conserved region (TonB box) of Escherichia coli outer membrane protein BtuB affect vitamin B12 transport . Point Mutations in a Conserved Region (TonB Box) of Escherichia coli Outer Membrane Protein BtuB Affect Vitamin B12 Transpo. *Journal of Bacteriology*, **171**(12), 6526-6533.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**(4), 557–580.
- Hantke, K.** (1987). Ferrous iron transport mutants in Escherichia coli K12. *FEMS Microbiology Letters*, **44**(1), 53–57.
- Harlow, E. und Lane, D.** (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hell, R. und Stephan, U. W.** (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, **216**(4), 541–551.
- Imai, K. und Mitaku, S.** (2005). Mechanisms of secondary structure breakers in soluble proteins. *BIOPHYSICS*, **1**, 55–65.

- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K., Nakazono, M., Nakanishi, H., Mori, S. und Nishizawa, N. K.** (2009). Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron (III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(6), 3470–3479.
- Ishimaru, Y., Kakei, Y., Shimo, H., Bashir, K., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H. und Nishizawa, N. K.** (2011). A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(28), 24649–24655.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsubashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. und Nishizawa, N. K.** (2006). Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant Journal*, **45**(3), 335–346.
- Le Jean, M., Schikora, A., Mari, S., Briat, J. F. und Curie, C.** (2005). A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant Journal*, **44**(5), 769–782.
- Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E. L. und Guerinot, M. Lou.** (2008). Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(30), 10619–24.
- Kabeya, Y., Nakanishi, H., Suzuki, K., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M. und Miyagishima, S.** (2010). The YlmG protein has a conserved function related to the distribution of nucleoids in chloroplasts and cyanobacteria. *BMC plant biology*, **10**(1), 57.
- Kammler, M., Schön, C. und Hantke, K.** (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, **175**(19), 6212–6219.
- Kikuchi, S., Bédard, J., Hirano, M., Hirabayashi, Y., Oishi, M., Imai, M., Takase, M., Ide, T. und Nakai, M.** (2013). Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science*, **339**(6119), 571–4.
- Kikuchi, S., Oishi, M., Hirabayashi, Y., Lee, D. W., Hwang, I. und Nakai, M.** (2009). A 1-megadalton translocation complex containing Tic20 and Tic21 mediates chloroplast protein import at the inner envelope membrane. *The Plant cell*, **21**(6), 1781–1797.
- Kim, M. K. und Kang, Y. K.** (1999). Positional preference of proline in alpha-helices. *Protein science*, **8**(7), 1492–9.
- Kim, S. A. und Guerinot, M. Lou.** (2007). Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters*, **581**(12), 2273–2280.
- Kirsch, F. und Eitinger, T.** (2014). Transport of nickel and cobalt ions into bacterial cells by S components of ECF transporters. *BioMetals*, **27**(4), 653–660.
- Kobayashi, T., Nakanishi Itai, R. und Nishizawa, N. K.** (2014). Iron deficiency responses in rice roots. *Rice*, **7**(1), 1–11.
- Kobayashi, T. und Nishizawa, N. K.** (2012). Iron uptake, translocation and regulation in higher plants. *Annual review of plant biology*, **63**(1), 131–152.

- Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. und Nishizawa, N. K.** (2004). OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant Journal*, **39**(3), 415–424.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). The promoter of TI-DNA gene5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet*, **204**, 383–396.
- Kovács-Bogdán, E., Benz, J. P., Soll, J. und Bölter, B.** (2011). Tic20 forms a channel independent of Tic110 in chloroplasts. *BMC Plant Biology*, **11**(133), 2–16. BioMed Central Ltd.
- Kunji, E. R. S., Slotboom, D. J. und Poolman, B.** (2003). Lactococcus lactis as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1610**(1), 97–108.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680–685.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**(21), 2947–2948.
- Lezhneva, L., Kuras, R., Ephritikhine, G. und De Vitry, C.** (2008). A novel pathway of cytochrome c biogenesis is involved in the assembly of the cytochrome b6f complex in Arabidopsis chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(36), 24608–24616.
- Li, J., Pandeya, D., Nath, K., Zulfugarov, I. S., Yoo, S. C., Zhang, H., Yoo, J. H., Cho, S. H., Koh, H. J., Kim, D. S., Seo, H. S., Kang, B. C., Lee, C. H. und Paek, N. C.** (2010). ZEBRA-NECROSIS, a thylakoid-bound protein, is critical for the photoprotection of developing chloroplasts during early leaf development. *Plant Journal*, **62**(4), 713–725.
- Lindsay, W. L. und Schwab, A. P.** (1982). The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition*, **5**(4–7), 821–840. Taylor & Francis.
- Liu, Y., Yang, Y., Qi, J., Peng, H. und Zhang, J.-T.** (2008). Effect of cysteine mutagenesis on the function and disulfide bond formation of human ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther.*, **326**(1), 33–40.
- López-Millán, A. F., Duy, D. und Philippar, K.** (2016). Chloroplast Iron Transport Proteins – Function and Impact on Plant Physiology. *Frontiers in Plant Science*, **7**(February), 1–12.
- Lv, H. X., Guo, G. Q. und Yang, Z. N.** (2009). Translocons on the inner and outer envelopes of chloroplasts share similar evolutionary origin in Arabidopsis thaliana. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**(7), 1418–1428.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Marlovits, T. C., Haase, W., Herrmann, C., Aller, S. G. und Unger, V. M.** (2002). The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(25), 16243–16248.
- Marschner, H.** (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Merchant, S. S.** (2006). Trace metal utilization in chloroplasts. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, **23**(Structure and Function of Plastids), 199–218.

- Mikami, Y., Saito, A., Miwa, E. und Higuchi, K.** (2011). Allocation of Fe and ferric chelate reductase activities in mesophyll cells of barley and sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**(5), 513–519. Elsevier Masson SAS.
- Möckli, N. und Auerbach, D.** (2004). Quantitative β -galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *BioTechniques*, **36**(5), 872–876.
- Morrissey, J., Baxter, I. R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N., Kaplan, J., Salt, D. E. und Guerinot, M. Lou.** (2009). The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in Arabidopsis. *The Plant cell*, **21**(10), 3326–38.
- Morrissey, J. und Guerinot, M. Lou.** (2009). Iron uptake and transport in plants: The good, the bad and the ionome. *Chem Rev.*, **109**(10), 4553–4567.
- Murgia, I., Tarantino, D., Soave, C. und Morandini, P.** (2011). Arabidopsis CYP82C4 expression is dependent on Fe availability and circadian rhythm and correlates with genes involved in the early Fe deficiency response. *Journal of Plant Physiology*, **168**(9), 894–902.
- Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **67**(4), 593–656.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H. und Nishizawa, N. K.** (2015). The phyto siderophore efflux transporter TOM2 is involved in metal transport in Rice. *Journal of Biological Chemistry*, **290**(46), 27688–27699.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H. und Nishizawa, N. K.** (2011). Phyto siderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(7), 5446–5454.
- Nozoye, T., Nakanishi, H. und Nishizawa, N. K.** (2013). Characterizing the Crucial Components of Iron Homeostasis in the Maize Mutants *ys1* and *ys3*. *PLoS ONE*, **8**(5), 1–11.
- Ogierman, M. und Braun, V.** (2003). Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: Studies of the FecA TonB box. *Journal of Bacteriology*, **185**(6), 1870–1885.
- Ogo, Y., Kakei, Y., Itai, R. N., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Takahashi, H., Nakazono, M. und Nishizawa, N. K.** (2014). Spatial transcriptomes of iron-deficient and cadmium-stressed rice. *New Phytologist*, **201**(3), 781–794.
- Puig, S., Andrés-Colás, N., García-Molina, A. und Peñarrubia, L.** (2007). Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: Responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment*, **30**, 271–290.
- Raven, J. A., Evans, M. C. W. und Korb, R. E.** (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthetic Research*, **60**(2–3), 111–150.
- Ravet, K., Touraine, B., Kim, S. A., Cellier, F., Thomine, S., Guerinot, M. Lou, Briat, J. F. und Gaymard, F.** (2009). Post-translational regulation of AtFER2 ferritin in response to intracellular iron trafficking during fruit development in Arabidopsis. *Molecular Plant*, **2**(5), 1095–1106.
- Reese, M. G.** (2000). *Computational prediction of gene structure and regulation in the genome of Drosophila melanogaster*. UC Berkeley/University of Hohenheim.
- Reese, M. G.** (2001). Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem*, **26**(1), 51–56.

- Robinson, N. J., Procter, C. M., Connolly, E. L. und Guerinot, M. Lou.** (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, **397**(6721), 694–697.
- Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand, M. S. und Eitinger, T.** (2006). Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *J. Bacteriol.*, **188**(1), 317–327.
- Rodríguez-Celma, J. und Schmidt, W.** (2013). Reduction-based iron uptake revisited. *Plant Signaling & Behavior*, **8**(11), e26116.
- Rogers, E. E. und Guerinot, M. L.** (2002). FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, **14**(8), 1787–1799.
- Römheld, V. und Marschner, H.** (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant physiology*, **80**, 175–180.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, **239**(4839), 487–491.
- Santi, S. und Schmidt, W.** (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytologist*, **183**(4), 1072–1084.
- Scandalios, J. G., Guan, L. und Polidoros, A. N.** (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*.
- Schaedler, T. A., Thornton, J. D., Kruse, I., Schwarzländer, M., Meyer, A. J., Van Veen, H. W. und Balk, J.** (2014). A conserved mitochondrial ATP-binding cassette transporter exports glutathione polysulfide for cytosolic metal cofactor assembly. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(34), 23264–23274.
- Schägger, H.** (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, **1**(1), 16–22.
- Schiestl, R. H. und Gietz, R. D.** (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, **16**(5–6), 339–346.
- Scholz, G., Becker, R., Pich, A. und Stephan, U. W.** (1992). Nicotianamine – a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: A review. *Journal of Plant Nutrition*, **15**(10), 1647–1665. Taylor & Francis.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U.-I. und Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant physiology*, **131**(1), 16–26.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. und Pessarakli, M.** (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, **2012**, 1–26.
- Shimoni-Shor, E., Hassidim, M., Yuval-Naeh, N. und Keren, N.** (2010). Disruption of Nap14, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in Arabidopsis thaliana results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures. *Plant, Cell and Environment*, **33**(6), 1029–1038.

- Shingles, R., North, M. und McCarty, R. E.** (2001). Direct measurement of ferrous ion transport across membranes using a sensitive fluorometric assay. *Analytical biochemistry*, **296**(1), 106–13.
- Shingles, R., North, M. und McCarty, R. E.** (2002). Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes. *Plant physiology*, **128**(3), 1022–1030.
- Sigrist, C. J. A., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L. und Xenarios, I.** (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, **41**(D1), 344–347.
- Solti, Á., Kovács, K., Basa, B., Vértés, A., Sárvári, É. und Fodor, F.** (2012). Uptake and incorporation of iron in sugar beet chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, **52**, 91–97.
- Solti, Á., Müller, B., Czech, V., Sárvári, É. und Fodor, F.** (2014). Functional characterization of the chloroplast ferric chelate oxidoreductase enzyme. *New Phytologist*, **202**(3), 920–928.
- Stübe, R.** (2013). *Metalltranslocon - Komplexe in Chloroplasten*. LMU München.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Senoura, T., Shimo, H., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H. und Nishizawa, N. K.** (2011). The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, **62**(14), 4843–4850.
- Tarantino, D., Morandini, P., Ramirez, L., Soave, C. und Murgia, I.** (2011). Identification of an Arabidopsis mitoferrinlike carrier protein involved in Fe metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**(5), 520–529. Elsevier Masson SAS.
- Teng, Y. S., Su, Y. S., Chen, L. J., Lee, Y. J., Hwang, I. und Li, H. M.** (2006). Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell*, **18**(9), 2247–2257.
- Terry, N. und Low, G.** (1982). Leaf chlorophyll content and its relation to the intracellular localization of iron. *Journal of Plant Nutrition*, **5**(4–7), 301–310. Taylor & Francis.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S.** (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, **269**(5227), 1069 LP-1074.
- Tzafrir, I., Pena-muralla, R., Dickerman, A., Berg, M., Rogers, R., Hutchens, S., Sweeney, T. C., Mcelver, J., Aux, G., Patton, D., Meinke, D. und Oklahoma, I. T.** (2004). Identification of Genes Required for Embryo Development in Arabidopsis 1 [w]. *Plant physiology*, **135**(July), 1206–1220.
- Van De Mortel, J. E., Villanueva, L. A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P. D., Ver, E., Van Themaat, L., Koornneef, M. und Aarts, M. G. M.** (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response and lignin biosynthesis distinguish roots of Arabidopsis thaliana and the related metal hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. *Plant Physiology*, **142**(November), 1127–1147.
- Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F. und Leister, D.** (2002). The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, **31**(5), 589–599.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. Lou, Briat, J. und Curie, C.** (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, **14**(6), 1223–33.

- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. und Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, **33**(5), 949–956.
- von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. A. und Hider, R. C.** (1999). Nicotianamine Chelates Both FeIII and FeII. Implications for Metal Transport in Plants. *Plant physiology*, **119**(3), 1107–1114.
- Waegemann, K., Eichacker, S. und Solu, J.** (1992). Planta as right-side-out vesicles. *Planta*, **187**(1), 89–94.
- Waters, B. M., Chu, H., Didonato, R. J., Roberts, L. A., Eisley, R. B., Lahner, B., Salt, D. E. und Walker, E. L.** (2006). Mutations in Arabidopsis yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiology*, **141**(August), 1446–1458.
- Weaver, E. A., Wyckoff, E. E., Mey, A. R., Morrison, R. und Payne, S. M.** (2013). FeoA and FeoC are essential components of the vibrio cholerae ferrous iron uptake system and FeoC interacts with FeoB. *Journal of Bacteriology*, **195**(21), 4826–4835.
- Wielopolska, A., Townley, H., Moore, I., Waterhouse, P. und Helliwell, C.** (2005). A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnology Journal*, **3**(6), 583–590.
- Wu, H., Li, L., Du, J., Yuan, Y., Cheng, X. und Ling, H. Q.** (2005). Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, **46**(9), 1505–1514.
- Yu, Y., Zhou, M., Kirsch, F., Xu, C., Zhang, L., Wang, Y., Jiang, Z., Wang, N., Li, J., Eitinger, T. und Yang, M.** (2014). Planar substrate-binding site dictates the specificity of ECF-type nickel/cobalt transporters. *Cell research*, **24**(3), 267–77. Nature Publishing Group.
- Zanin, L., Venuti, S., Zamboni, A., Varanini, Z., Tomasi, N. und Pinton, R.** (2017). Transcriptional and physiological analyses of Fe deficiency response in maize reveal the presence of Strategy I components and Fe/P interactions. *BMC Genomics*, **18**(1), 154.
- Zhang, X. Y., Zhang, X., Zhang, Q., Pan, X. X., Yan, L. C., Ma, X. J., Zhao, W. Z., Qi, X. T. und Yin, L. P.** (2017). Zea mays Fe deficiency-related 4 (ZmFDR4) functions as an iron transporter in the plastids of monocots. *Plant Journal*, **90**(1), 147–163.
- Zhou, C., Yang, Y. und Jong, A. Y.** (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*, **8**(2), 172–173.

Veröffentlichung

Hagl, P., Stübe, R., Mayer, K., Vasquez-Robinet, C. und **Philippa, K.** The metal translocon complex PIC1-NiCo-YGGT at the inner envelope of chloroplasts. *Plant Physiology, in Vorbereitung*.

Poster

Peter Hagl, Roland Stübe, Katrin Philippa

The PIC1-NiCo-YGGTc metal translocon in chloroplast envelopes.

Tagung: From Molecules to the field – Botanikertagung,

Freising, Deutschland (2015)

Peter Hagl, Roland Stübe, Katrin Philippa

The PIC1-NiCo-YGGTc metal translocon in chloroplast envelopes.

Tagung: 17. International Symposium on Iron Nutrition und Interactions in Plants,

Gatersleben, Deutschland (2014)